

Ćwiczenie 5. Wiązanie leków z białkami

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stopnia wiązania gliklazu z białkami osocza, metodą ultrafiltracji zastosowanej do rozdzielenia leku wolnego od związanego.

Opracowanie: dr Matylda Resztak, prof. dr hab. Franciszek Główka

Wprowadzenie

W większości przypadków w rutynowym monitorowaniu leku w ustroju oznacza się stężenie całkowite leku w osoczu lub surowicy krwi. Efekt terapeutyczny leku zależy jednak od jego frakcji wolnej, niezwiązanej z białkiem. Temu samemu stężeniu całkowitemu może więc towarzyszyć różne działanie w przypadku istotnie różnych stężeń frakcji wolnej (tzn. gdy stężenie całkowite w przypadku A i B będzie to samo, ale w sytuacji A frakcja wolna będzie stanowić 50%, a w sytuacji B 90%, to oczywiście silniejszy efekt będziemy obserwować w sytuacji B).

Najczęściej wiązanie leku z białkami osocza lub tkanek ma charakter niespecyficzny. Lek wiąże się z dowolnym białkiem, w konsekwencji różne leki mogą być związane w tym samym miejscu w cząsteczce białka. Wówczas lek o słabszym powinowactwie do miejsc wiążących będzie wypierany przez lek o większym powinowactwie. W przypadku wiązania specyficznego, białka są odpowiednio dopasowane do każdego leku.

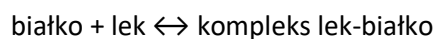
Farmakologiczne działanie leku polega m.in. na wzajemnym oddziaływaniu właściwej cząsteczki związku i receptora. Cząsteczka leku związanego z białkiem jest farmakologicznie nieaktywna. Kompleks lek-białko jest zbyt duży, aby przejść przez błony biologiczne i dotrzeć do receptora znajdującego się w tkankach. Tylko lek wolny jest aktywny farmakologicznie.

Najważniejsze białka osocza, które wiążą leki to albumina i kwaśna α_1 -glikoproteina, ponadto lipoproteiny i gammaglobuliny. W przypadku pełnej krwi dodatkowym czynnikiem wiążącym lek, mogą być również komórki krwi, głównie erytrocyty. Większość leków wiąże się z białkiem odwracalnie przy udziale wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych lub sił van der Waalsa, tworząc tzw. depot (magazyn), z którego stopniowo uwalniają się cząsteczki leku, zastępując te, które uległy już eliminacji. Wiązanie nieodwracalne jest dość rzadkie, lek wiąże się w takim przypadku z białkiem najczęściej za pomocą wiązania kowalencyjnego.

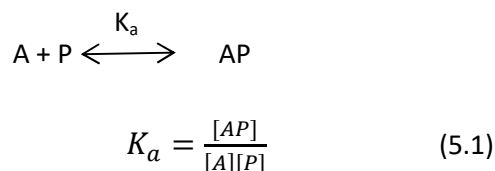
Do parametrów charakteryzujących wiązanie leków z białkami zaliczyć należy: stałą wiązania, liczbę miejsc wiążących, stopień wiązania oraz czynniki determinujące wiązanie, takie jak: stężenie leku, stężenie białka, rodzaj białka biorącego udział w wiązaniu, pH, a także siłę jonową.

Ilościowy opis wiązania leku z białkami

Reakcja wiązania leku z białkiem przebiega zgodnie z prawem działania mas Guldberga-Waagego:



Stopień wiązania leku [A] z białkiem [P] można określić ilościowo przez stałą wiązania w stanie równowagi K_a :



gdzie:

K_a – stała wiązania w stanie równowagi

[A] – stężenie białka

[P] – stężenie wolnego leku

[AP] – stężenie kompleksu lek-białko

Stężenie leku związanego wyznaczyć można:

$$[AP] = K_a[A][P] \quad (5.2)$$

Wielkością charakteryzującą zdolność tworzenia kompleksu substancji leczniczej z białkiem jest wartość r , która oznacza liczbę moli leku związanego przez jeden mol białka. Przy założeniu, że na cząsteczce białka znajduje się jedno miejsce wiążące lek (czyli lek wiąże się z białkiem w stosunku 1:1), ilość leku przypadającą na cząsteczkę białka można przedstawić jako stosunek stężenia leku związanego [AP] do całkowitego stężenia białka

$$r = \frac{[AP]}{[AP] + [P]} = \frac{[AP]}{[P]_{tot}} \quad (5.3)$$

Wyznaczając z równania 5.2 stężenie leku związanego i po podstawieniu do równania 5.3, otrzymuje się zależność:

$$r = \frac{K_a[A][P]}{K_a[A][P] + [P]} = \frac{K_a[A]}{K_a[A] + 1} \quad (5.4)$$

Jeżeli istnieje n identycznych i niezależnych miejsc wiążących na cząsteczce białka, to:

$$r = \frac{n \cdot K_a[A]}{K_a[A] + 1} \quad (5.5)$$

Jeżeli dostępnych jest więcej niż jeden rodzaj miejsc wiążących, to równanie przyjmuje postać:

$$r = \frac{n_1 \cdot K_{a1} \cdot [A]}{K_{a1}[A] + 1} + \frac{n_2 \cdot K_{a2} \cdot [A]}{K_{a2}[A] + 1} + \dots \quad (5.6)$$

Transformacje liniowe równania 5.5 pozwalające na wyznaczenie stałych n i K_a to: odwrócone równanie Klotza, równanie Scatcharda i równanie Rosenthala.

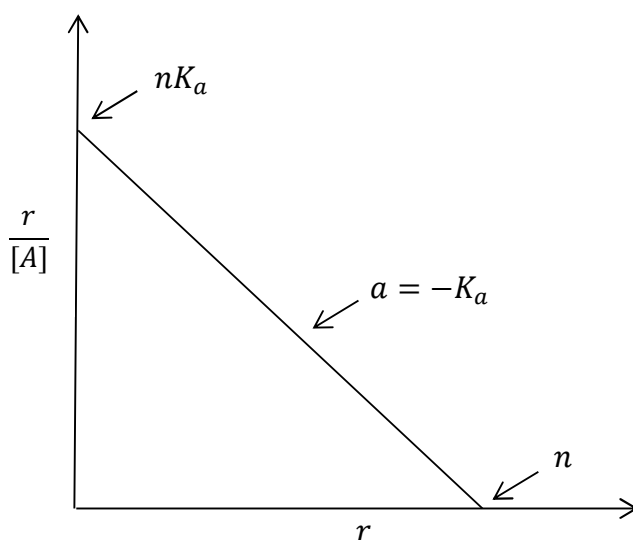
W celu uzyskania równania Scatcharda należy pomnożyć równanie 5.5 przez wartość jego mianownika i odpowiednio przegrupować wyrazy:

$$r + K_a[A]r = nK_a[A] \quad (5.7)$$

$$r = nK_a[A] - K_a[A]r \quad (5.8)$$

$$\frac{r}{[A]} = nK_a - K_a r \quad (5.9)$$

Zgodnie z równaniem 5.9 stosunek $r/[A]$ jest liniową funkcją r o współczynniku kierunkowym równym $a = -K_a$ oraz punkcie przecięcia z osią rzędnych $b = nK_a$ (Ryc. 5.1.).

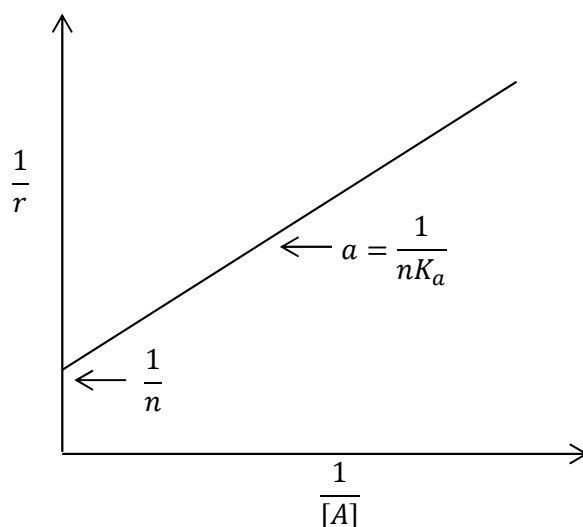


Ryc. 5.1. Wykres Scatcharda

Równanie Klotza otrzymuje się poprzez odwrócenie równania 5.5 i rozdzielenie prawej strony równania na dwa ułamki proste. Wykres liniowy zależności $1/r$ jako funkcja $1/[A]$ przedstawia Ryc. 5.2.:

$$\frac{1}{r} = \frac{1 + K_a \cdot [A]}{n \cdot K_a \cdot [A]} \quad (5.10)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n \cdot K_a} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{n} \quad (5.11)$$



Ryc. 5.2. Wykres Klotza

Oznaczenie stężenia białek pozwala na wyznaczenie wartości r , jednak w farmakokinetyce ważnym parametrem jest ułamek leku związanego z białkami osocza, gdyż tylko wolna frakcja jest aktywna farmakologicznie.

Ułamek leku związanego z białkami osocza f_b w odniesieniu do całkowitego stężenia leku ($[A]_{tot}$) wyznaczyć można z zależności:

$$f_b = \frac{[AP]}{[A]_{tot}} = \frac{[AP]}{[AP] + [A]} \quad (5.12)$$

Związek między wartościami r i f_b przedstawia równanie:

$$r = \frac{[A]_{tot}}{[P]_{tot}} \cdot f_b \quad (5.13)$$

gdzie $[P]_{tot}$ oznacza całkowite stężenie białka do którego lek ma powinowactwo.

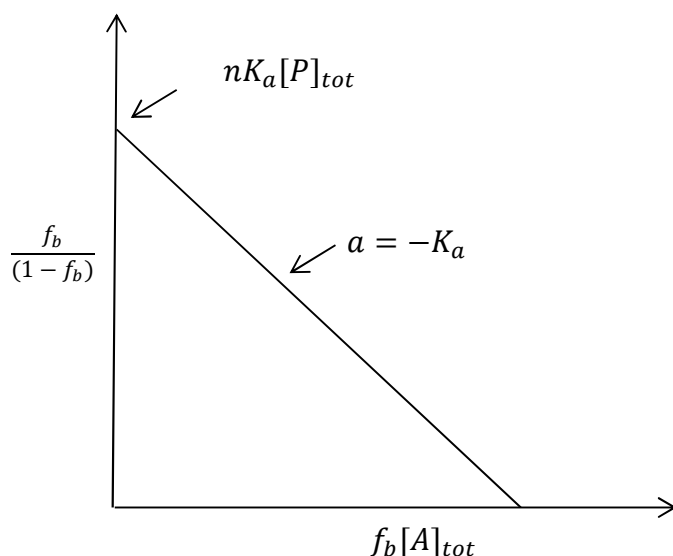
Modyfikacja równania 5.9 umożliwia graficzne wyznaczenie stałej K_a

$$\frac{r}{[A]} = nK_a - K_a r = \frac{f_b}{(1 - f_b)[P]_{tot}} \quad (5.14)$$

stąd:

$$\frac{f_b}{(1-f_b)} = nK_a[P]_{tot} - K_a f_b[A]_{tot} \quad (5.15)$$

Graficzną postacią równania 5.15 jest wykres Rosenthala (Ryc. 5.3.), który przedstawia stosunek frakcji związanej leku do frakcji wolnej jako zależność stężenia leku związanego z białkiem. Wykres jest linią prostą o współczynniku kierunkowym równym $-K_a$ oraz wartości przecięcia $nK_a[P]_{tot}$



Ryc. 5.3. Wykres Rosenthala

Metody badania wiązania leku z białkami

W warunkach *in vitro*, przy zastosowaniu odpowiednich technik analitycznych możemy określić stopień, w jakim dany lek związany jest z białkami osocza. Podstawową zasadą większości metod analitycznych ilościowego oznaczania wiązania leków z białkami jest oddzielenie leku wolnego od dużej cząsteczki białka, względnie kompleksu lek – białko. Najczęściej stosowane metody to: dializa równowagowa, mikrodializa, ultrafiltracja, ultrawirowanie. Każda z tych metod posiada zarówno zalety, jak i wady.

Dializa równowagowa - stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych metod oznaczania wolnej frakcji leku. Oznaczenie tą metodą przebiega w komorze dializacyjnej składającej się z dwóch części oddzielonych z pomocą półprzepuszczalnej błony. W jednej części znajduje się badane osocze, w

drugiej wolny od białek izotoniczny roztwór buforowy. Wskutek związania części leku z białkiem jego całkowite stężenie po obu stronach membrany nie będzie jednakowe, ponieważ zdolność do przenikania przez błonę posiada tylko wolna forma leku. Po ustaleniu się stanu równowagi, oznacza się stężenie wolnego leku w komorze z buforem. Znając całkowite stężenie leku, można obliczyć ułamek ilości leku związanego z białkami z następującej zależności.

$$f_b = \frac{A_b}{A_{tot}} = \frac{A_{tot} - A_u}{A_{tot}} = \frac{A_{tot} - C_u \cdot V_{tot}}{A_{tot}}$$

gdzie:

f_b – ułamek ilości leku związanego z białkami

A_b – ilość leku związanego z białkami

A_u – ilość leku wolnego

A_{tot} – całkowita ilość leku

C_u – stężenie leku wolnego

V_{tot} – objętość całkowita osocza i buforu

Ograniczeniem tej metody jest stosunkowo długi czas ustalania się stanu równowagi stężenia leku wolnego po obu stronach membrany. Czynnikiem wpływającym na szybkość jej ustalenia jest m.in temperatura oraz rodzaj stosowanej membrany. Do błędnych wniosków w tej metodzie może prowadzić bezpośrednie porównanie stężeń leku po obu stronach błony. W trakcie procesu, wskutek zjawiska osmozy cząsteczki wody dyfundują przez błonę do komory z osoczem, zwiększając jego objętość, a tym samym zmniejszając stężenie leku i białka po tej stronie błony. Stąd bardzo istotne są warunki izosmotyczne. Inną przyczyną błędów może być również adsorpcja niektórych leków na komorze dializacyjnej. Pomimo tych ograniczeń metoda ta stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych metod oznaczania wolnej frakcji leku, ze względu na niski koszt analizy, wysoką powtarzalność wyników oraz małe objętości próbek osocza wykorzystywanych w badaniu.

Mikrodializa – jest szybką i prostą metodą wyznaczania stopnia wiązania leku z białkami. Opiera się na zastosowaniu sondy mikrodializacyjnej wyposażonej w błonę półprzepuszczalną, którą umieszcza się w badanej próbce a następnie przepłukuje się ją roztworem Ringera. W wyniku ciągłego przepływu płynu perfuzyjnego nie dochodzi do osiągnięcia stanu równowagi. Następnie określa się współczynnik odzysku w buforze nie zawierającym białek, dzięki czemu możliwe jest obliczenie stężenia leku wolnego oraz stopnia wiązania z białkami osocza.

Ultrafiltracja – często stosowana metoda wyznaczania wiązania leku z białkami ze względu na krótki czas analizy i proste wykonanie. W metodzie tej wykorzystuje się specjalne naczynka wyposażone w błonę półprzepuszczalną (błona filtracyjna o ściśle określonej wielkości porów – np. 30K – tzn że przez filtr przejdą cząsteczki o masie poniżej 30 kDa). W czasie wirowania lek wolny oddzielony zostaje od leku związanego z białkiem i wolnego białka (duże cząsteczki zostają na błonie filtracyjnej, mniejsze przechodzą do probówki, w której umieszczany jest wkład z filtrem). Obliczenie stopnia wiązania leku z białkami osocza przeprowadza się podobnie jak w przypadku dializy. Stosując tę metodę należy zwrócić uwagę, aby nie odwirować zbyt dużej ilości osocza, powyżej 20% całkowitej objętości wziętej do analizy, może prowadzić to bowiem do zaburzenia równowagi wskutek zmiany stężenia białka. Ograniczeniem tej metody jest również możliwość adsorpcji niektórych leków na filtrze lub na naczynku. W celu uniknięcia błędu pomiaru należy ocenić zjawisko adsorpcji leku poprzez wyznaczenie wartości wiązań niespecyficznych NSB (*non-specific binding*). Ewentualny efekt adsorpcji próbuje się minimalizować poprzez zastosowanie przed analizą antyadsorbentów nanoszonych na filtr np. 0,5% Tweenu, lub przez nasycenie błony roztworem z lekiem w stężeniu odpowiadającym stężeniu leku niezwiązanego.

Ultrawirowanie – metodę tę wykorzystuje się w przypadku gdy obserwowany jest wysoki stopień adsorpcji leku na membranie lub filtrze. Lek wolny od kompleksu leku z białkiem o dużo większej masie cząsteczkowej oddziela się w wyniku wirowania, pozostałą wodę osocza poddaje się analizie celem obliczenia stopnia wiązania leku z białkami. Zaletą tej metody jest brak występowania efektu Donnana oraz fakt, że stężenie leku w układzie jest stałe. Ograniczeniem jest natomiast możliwość wiązania się leku z lipoproteinami, które w wyniku małej gęstości mają tendencję do flotacji. Wadą tej metody jest również jej wysoki koszt oraz długi czas trwania analizy.

Czynniki wpływające na stopień wiązania leku z białkami

Zmiana stężenia białek osocza. Stan fizjologiczny (wiek, płeć, ciąża, stany chorobowe) ma wpływ na wiązanie leków z białkami. Związane jest to głównie ze zmianami stężenia w osoczu albuminy, α_1 -glikoproteiny, wolnych kwasów tłuszczowych i bilirubiny. Stężenie albuminy w osoczu zmniejsza się u chorych z nieprawidłową czynnością wątroby, w wyniku tego stężenie leku wolnego wzrasta (diazepam), choć całkowite stężenie leku może pozostać niezmienione ze względu na zmniejszoną zdolność wątroby do metabolizowania leku wolnego. Również podwyższony poziom bilirubiny, która ma zdolność wypierania leków z połączeń z białkami może zmniejszać stopień wiązania leku z białkiem.

Wiązanie z białkami osocza wielu leków (fenytoiny, sulfonamidów, fenylobutazonu, kwasu walproinowego, furosemidu, diazepamu) obniża się u pacjentów z niewydolnością nerek. Wiązanie z białkami osocza fenytoiny osiąga wartość ok. 90% (wartość prawidłowa), a u pacjentów u których zdiagnozowano zespół nerczycowy może zmniejszyć się nawet do 60%. Wykazano, że każdemu obniżeniu albuminy w surowicy o 1 g/l (wartość prawidłowa 37 g/l) towarzyszy zwiększenie stężenia frakcji wolnej leku o 1% . Obniżenie poziomu albumin do 27 g/l powoduje zwiększenie wolnej frakcji leku z 10 % do 20 %. Przedział terapeutyczny fenytoiny całkowitej to 10-20 µg/ml u pacjentów z normalbuminemią (przy wiązaniu z białkiem na poziomie 90%, frakcja wolna leku stanowi 10%, a więc zakres terapeutyczny dla leku wolnego to 1-2 µg/ml). U osoby z hipoalbuminemią na poziomie 27 g/l, jeśli chcemy utrzymać stężenie leku wolnego na tym samym poziomie 1-2 µg/ml, przedział terapeutyczny określany dla całkowitego stężenia musiałby wynosić 5-10 µg/ml. W takiej sytuacji do prawidłowego monitorowania terapii konieczne jest oznaczenie stężenia frakcji wolnej leku.

Stężenie kwaśnej α_1 -glikoproteiny zwiększa się w stanach zapalnych, w stresie, w przypadku chorób nowotworowych czy zawału mięśnia sercowego, spada natomiast w schorzeniach nerek i wątroby. Dla leków silnie wiążących się z glikoproteiną (lidokaina, propranolol, chinidyna) stężenie całkowite leku w osoczu, w pierwszych z przytoczonych sytuacji może osiągnąć wymagany poziom terapeutyczny, podczas gdy stężenie leku wolnego będzie poniżej tego poziomu. Frakcja wolna lidokainy wynosząca zwykle od 20 do 40%, zmniejsza się poniżej 20% u pacjentów po zawale serca, u których obserwowany jest wysoki poziom α_1 -kwaśnej glikoproteiny, co powoduje zmniejszenie skuteczności działania leku.

Współzawodnictwo o miejsca wiążące na białku. W praktyce terapeutycznej bardzo często wymagane jest stosowanie kilku leków równocześnie. Ponieważ leki posiadają różne powinowactwo do cząsteczki białka, zdarza się, że lek posiadający większe powinowactwo do tego samego miejsca wiązania wyprze inny z jego kompleksu z białkiem. Zwiększy się w ten sposób stężenie frakcji wolnej leku wypieranego we krwi, a tym samym wzrośnie efekt terapeutyczny. Przykładem takiego procesu jest wzrost stężenia wolnej fenytoiny w obecności kwasu walproinowego. Wolna fenytoina ulega szybszej eliminacji, co z kolei prowadzi do obniżenia jej stężenia w stanie stacjonarnym. Kolejnym przykładem jest wypieranie fenprokumonu z jego miejsca wiązania z białkiem przez fenylobutazon. Liczne badania wykazały jednak, że obserwowane krwawienie związane ze wzrostem działania pochodnej kumaryny powodowane jest hamowaniem przez fenylobutazon metabolizmu fenprokumonu. Obniżony w ten sposób klirens wewnętrzny fenprokumonu prowadzi do wzrostu jego frakcji wolnej i w konsekwencji do wystąpienia objawów toksycznych.

Także substancje endogenne, jak np. bilirubina, mogą zostać wyparte przez leki z ich miejsc wiążących na białku. Przykładem są sulfonamidy wypierające bilirubinę z postaci związanej z białkiem

do postaci wolnej. Podanie ich noworodkom może doprowadzić do wystąpienia żółtaczki, w skrajnym przypadku do żółtaczki jąder podkorowych mózgu.

Interakcje polegające na wypieraniu z połączeń z białkiem jednego leku przez drugi mają istotne znaczenie w przypadku leków, które wiążą się z białkami w ponad 95% i charakteryzują się wąskim indeksem terapeutycznym. Np. gdy lek wiąże się w 95% z białkiem, nawet niewielkie (o 5%) zastąpienie leku w jego wiązaniu z białkiem przez inny lek powoduje znaczący (5% leku wolnego vs $5+5=10\%$ frakcji wolnej, a więc wzrost o 100%!) wzrost stężenia leku wolnego. W przypadku leków średnio wiążących się z białkami osocza (50%) obserwowany w wyniku podania innego konkurującego leku, wyparcie 10% puli leku związanego z białkiem nie będzie miało tak znaczącego wpływu na efekt terapeutyczny.

Wysycenie miejsc wiążących w cząsteczce białka. Cząsteczka białka posiada ograniczoną liczbę miejsc wiążących w stosunku do danego leku. Dla większości leków stężenie białka jest dużo większe niż stężenie leku, dlatego wysycenie miejsc wiążących nie jest możliwe. Jednak w przypadku pewnej grupy leków występujących w osoczu w stężeniu terapeutycznym, których wiązanie z białkiem zależy od stężenia, może dojść do takiej sytuacji. Dzieje się tak np. w przypadku kwasu walproinowego, gdy przy wzroście stężenia całkowitego może dojść do wysycenia przez lek miejsc wiążących, a co za tym idzie do nawet 10-krotnego wzrostu stężenia leku wolnego.

Wpływ wiązania leku z białkami na parametry farmakokinetyczne

Część leku, która związana jest z białkiem, jest farmakologicznie nieaktywna i spełnia rolę magazynu, podczas gdy forma wolna posiada zdolność przenikania do tkanek i wywiera działanie farmakologiczne. Zmiana stopnia wiązania leku z białkami wpływa na jego objętość dystrybucji, klirens i biologiczny okres półtrwania.

Objętość dystrybucji. Wiązanie leku z białkami to jeden z czynników wpływających na rozmieszczenie leku w organizmie, a więc na wartość jego objętości dystrybucji. Zależność między wiązaniem leku z białkami, a objętością dystrybucji przedstawia następujący wzór:

$$V_d = V_B + \frac{f_u}{f_{u(T)}} V_T$$

gdzie:

V_d – objętość dystrybucji

V_B – objętość krwi

f_u – ułamek leku wolnego we krwi

$f_{u(T)}$ – ułamek leku wolnego w tkankach

V_T – różnica między całkowitą objętością płynów ustrojowych a objętością krwi

Dla substancji słabo wiążących się z białkami osocza i tkanek objętość dystrybucji odpowiada fizjologicznej objętości płynów, w których lek jest rozmieszczony. Przykładem mogą być antybiotyki aminoglikozydowe, które nie przenikają do wnętrza komórek i rozmieszczone są głównie w wodzie zewnątrzkomórkowej. Ich objętość dystrybucji wynosi ok. 0,25 l/kg. W przypadku leku dobrze wiążącego się z białkami osocza i tkanek na wartość objętości dystrybucji wpływa iloraz frakcji niezwiązanych leku f_u i $f_{u(T)}$. Niewielka wartość objętości dystrybucji ibuprofenu 0,15 l/kg związana jest z faktem, iż lek w 99% wiąże się z białkami osocza, w którym osiąga wysokie stężenie. Z kolei diazepam wykazujący właściwości lipofilne w dużym stopniu (ok. 99%) wiąże się z białkami tkanek i jego objętość dystrybucji wynosi ok. 1,1 l/kg. Objętość dystrybucji digoksyny jest duża i wynosi ok 7,3 l/kg, ponieważ lek w niewielkim stopniu wiąże się z białkami osocza, ale ma duże powinowactwo do tkanek (zagadnienie omówiono w materiałach do ćw. 1).

Klirens. Wiązanie leków z białkami ma również w niektórych przypadkach wpływ na klirens, metabolizowane mogą być bowiem tylko wolne cząsteczki leku (zagadnienie omówione również w materiałach do ćw. 1). Główne narządy odpowiedzialne za eliminację leku to wątroba i nerki, dlatego duże znaczenie ma klirens wątrobowy oraz klirens nerkowy leku. W przypadku leków o dużym współczynniku ekstrakcji ($ER > 0,7$, np. propranolol) wątroba zdolna jest całkowicie usunąć lek wpływający do niej wraz z krwią. Wiązanie leku z białkami nie ma w tym przypadku wpływu na klirens wątrobowy leku, a jego wartość zależy głównie od przepływu krwi przez ten narząd. Dla leków o małym współczynniku ekstrakcji ($ER < 0,3$, np. fenytoina, warfaryna) szybkość eliminacji zależy od stężenia leku wolnego i klirens wątrobowy zmienia się proporcjonalnie wraz ze zmianą stężenia jego frakcji wolnej, co wynika z następującej zależności:

$$Cl_H \approx Cl_{int} \cdot f_u$$

gdzie:

Cl_H – klirens wątrobowy

Cl_{int} – klirens wewnętrzny

f_u – ułamek leku wolnego we krwi

Wiązanie leku z białkami osocza wpływa również na klirens nerkowy. Duże cząsteczki białka nie przechodzą przez filtr nerkowy (nie ulegają filtracji kłębuszkowej) i pozostają we krwi. Tylko lek wolny ulega filtracji w kłębuszkach nerkowych, a szybkość filtracji zależy wprost proporcjonalnie od ułamka leku wolnego.

Klirens odpowiadający filtracji kłębkowej leku będzie równy:

$$Cl_{rf} = Cl_{kr} \cdot f_u$$

gdzie:

Cl_{rf} – klirens odpowiadający filtracji kłębkowej

Cl_{kr} – klirens kreatyniny

f_u – ułamek leku wolnego we krwi.

Biologiczny okres półtrwania. Wpływ stopnia wiązania na czas $t_{0,5}$ zależy od wartości takich parametrów jak klirens i objętość dystrybucji. W przypadku niewydolności nerek całkowity klirens fenytoiny wzrasta w związku ze zmniejszeniem się jej stopnia wiązania z białkami, co wpływa na skrócenie jej biologicznego okresu półtrwania. Z kolei klirens wątrobowy propranololu zależy głównie od przepływu krwi przez wątrobę, a mniejsze znaczenie ma wiązanie leku z białkami. Zmiana objętości dystrybucji przy stałym klirensie leku powoduje więc zmianę biologicznego okresu półtrwania. W przypadku zmniejszenia stopnia wiązania propranololu z białkami jego $t_{0,5}$ się wydłuża ze względu na wzrost objętości dystrybucji leku.

Podsumowując, zmiana stopnia wiązania leku z białkami nie zawsze wpływa na stężenie leku niezwiązanego, gdyż jednocześnie zmienia się jego klirens. Co za tym idzie, nie wpływa ona również na efekt kliniczny czy występowanie efektów ubocznych. Rutynowe monitorowanie leku wolnego jest trudne z analitycznego punktu widzenia i obciążone jest większym błędem niż pomiar stężenia całkowitego leku. Istnieją jednak przypadki gdy monitorowanie leku wolnego jest wskazane:

- W przypadku braku odpowiedzi klinicznej po podaniu dawki leku charakteryzującego się wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, jak również, kiedy silny efekt farmakologiczny obserwowany jest po podaniu małej dawki.
- W przypadku politerapii, kiedy stosowane są leki o wysokim stopniu wiązania się z białkami osocza i konkurują o te same miejsca wiążące w cząsteczce białka.

Piśmiennictwo:

1. Hermann T.W. *Farmakokinetyka. Teoria i praktyka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
2. Derendorf H., Schäfer H.G., Staab A. (aut). Wyska E. (red). *Farmakokinetyka. Podstawy i znaczenie praktyczne*. MedPharm Polska, Wrocław 2013.

3. Skibińska Ł., Hermann T.W. *Ćwiczenia z farmakokinetyki*. Wydawnictwa Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2003.