



BIULETYN  
Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2017, 6, 50-59  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## ZWIĄZKI WIĄŻĄCE SIĘ Z BIAŁKAMI OSOCZA U LUDZI. ZNACZENIE W TERAPII ORAZ METODY OZNACZANIA WOLNEJ FRAKCJI

Martyna Chechłacz, Natalia Korytowska\*

Zakład Bioanalizy i Analizy Leków, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

\* autorka korespondująca, tel: +48 22 572 0949, e-mail: [natalia.korytowska@wum.edu.pl](mailto:natalia.korytowska@wum.edu.pl)

Otrzymany 27.07.2017, zaakceptowany 25.10.2017, zamieszczony 16.11.2017

### STRESZCZENIE

Wiele substancji endogennych oraz egzogennych wykazuje zdolność do wiązania się z białkami osocza, głównie z ludzką albuminą surowicy oraz  $\alpha$ -1-kwaśną glikoproteina. Substancje te w krwioobiegu występują zarówno w formie wolnej jak i związanej z białkami. Białko posiada na swojej powierzchni miejsca wiązania charakterystyczne dla danego związku, różniące się wielkością, kształtem oraz powinowactwem. Wiązanie z białkami następuje w wyniku oddziaływań hydrofobowych, van der Waalsa oraz elektrostatycznych. Stopień wiązania z białkami osocza zależy od m.in. obecności stanu zapalnego, występowania chorób nerek i wątroby oraz wieku. Jedynie forma wolna związku jest aktywna biologicznie oraz jest zdolna do pokonywania barier biologicznych. W związku z tym duże znaczenie mają metody pomiaru stężenia frakcji niezwiązanej z białkami w osoczu. Najczęściej stosowana jest dializa równowagowa, uznawana za metodę referencyjną. Inne metody to m.in. ultrafiltracja, ultrawirowanie, mikrodializa, mikroekstrakcja, wysokosprawna analiza człowa oraz ekstrakcja w punkcie zmętnienia.

**SŁOWA KLUCZOWE:** frakcja niezwiązana z białkami, lek, albumina, białka osocza, ultrafiltracja, dializa równowagowa.

### ABSTRACT

COMPOUNDS THAT BIND TO PLASMA PROTEINS IN HUMANS. SIGNIFICANCE IN THERAPY AND METHODS FOR QUANTIFICATION OF A FREE FRACTION

Many endogenous and exogenous substances are able to bind to plasma proteins, mainly to human serum albumin and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein. In the bloodstream, these substances are present both in a free and in a protein-bound form. The protein has on its surface binding sites, specific for a given compound, which differ in size, shape and affinity. Binding is mediated by hydrophobic, van der Waals and/or electrostatic interactions. The extent to which compounds bind to plasma proteins depends on a number of different factors, including the presence of inflammation, kidney and liver diseases, and age. Only the free fraction is biologically active and is able to cross biological barriers. Therefore, methods of measuring the free plasma concentration of compounds are crucial. The most commonly used method is equilibrium dialysis, which is considered to be the reference method. Other methods include ultrafiltration, ultracentrifugation, microdialysis, microextraction, high-performance frontal analysis and cloud point extraction.

**KEYWORDS:** unbound fraction, drug, albumin, plasma proteins, ultrafiltration, equilibrium dialysis.

### 1. Białka osocza wiążące substancje endogenne oraz egzogenne

Najważniejszymi białkami osocza, z którymi wiążą się zarówno substancje endogenne, jak i egzogenne, są:

- ludzka albumina surowicy (HSA),
- $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina (AGP) [1,2,3].

Inne białka to m.in.:

- transferyna - odpowiada za wiązanie i transport utlenionej postaci jonów żelaza (III),
- transkobalamina - odpowiada za transport kobalaminy, czyli witaminy B12,
- tyreoglobulina - odpowiada za wiązanie i transport hormonów tarczycy, takich jak tyroksyna i trójjodotyronina,
- haptoglobina - białko ostrej fazy odpowiadające za wychwytywanie wolnej hemoglobiny,

- białko wiążące kortykosterydy - odpowiada za transport hormonów steroidowych, takich jak kortyzol,
- lipoproteiny - odpowiadają za wiązanie i transport cholesterolu i triglicerydów oraz leków wysoko hydrofobowych,
- immunoglobuliny - przeciwciała, które są zdolne do swoistego rozpoznawania i wiązania antygenów [1,4,5,6,7-14].

#### 1.1. Albumina

Albumina jest najpowszechniej występującym białkiem osocza, stanowi 55-65% wszystkich białek krwi. Jest głównym białkiem transportującym, posiada zdolność do wiązania ligandów, zarówno kwaśnych jak i obojętnych. We krwi wiąże się z wieloma substancjami, m.in. witaminami, metabolitami, barwnikami i lekami, wpływa także na utrzymanie prawidłowej objętości i pH krwi oraz wykazuje znaczny potencjał antyoksydacyjny [5,6,15-19].

Albumina jest jednym z najmniejszych białek obecnych w osoczu (66 kDa), zbudowanym z 585 aminokwasów. Ze względu na bardzo złożoną strukturę, kształt cząsteczki albuminy jest uwarunkowany przez sekwencję tworzących ją aminokwasów. Badania dyfrakcji rentgenowskiej wykazały, że cząsteczka ta składa się z trzech domen tworzących III-rzędową strukturę - I, II oraz III, z których każda podzielona jest na subdomeny A oraz B [15,17,20,21].

Taka struktura cząsteczkowa albuminy powoduje, iż wiązanie związków powinno być rozpatrywane na dwóch poziomach. Szkielet konstrukcyjny albuminy określa miejsce wiązania związku, natomiast elementy konstrukcyjne cząsteczki wpływają na siłę wiązania w danym miejscu [15].

W strukturze albuminy nie występują struktury  $\beta$ -harmonijki, co zapewnia białku wysoką elastyczność konformacyjną. Dzięki temu HSA posiada wiele hydrofobowych miejsc wiążących i wiąże zarówno egzogenne jak i endogenne związki, co zostało potwierdzone poprzez zastosowanie m.in. badań krystalografii rentgenowskiej [21]. Wyszczególniono sześć głównych miejsc wiążących w cząsteczce albuminy, które wykazują wysoką specyficzność dla ligandów. Dzięki różnicom w budowie tych miejsc, które cechuje odmienna wielkość i polarność, możliwe jest jednoczesne wiązanie związków o różnych strukturach i rozmiarach. Najlepiej scharakteryzowano dwa miejsca wiązania, które wykazują wysokie powinowactwo do leków i ligandów endogennych. Miejsca te znajdują się w subdomenie IIA i IIIA i wykazują tendencję do wiązania związków kwaśnych i lipofilowych [1,3,5,6,15,16].

Między albuminą a ligandem mogą powstawać oddziaływania o bardzo różnym charakterze, np. sił van der Waalsa, sił elektrostatycznych, wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych oraz nieodwracalne wiązania kowalencyjne [19].

Mały rozmiar, długi okres półtrwania, duże stężenie oraz ilość miejsc wiążących tłumaczy fakt, że tak wiele związków metabolicznych i leków terapeutycznych jest transportowanych przez albuminy [1,4].

## 1.2. $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina

Ludzka  $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina (38-48 kDa) to dodatnie białko ostrej fazy wykazujące aktywność przeciwzapalną oraz wiążące i transportujące wiele substancji. AGP produkowana jest w wątrobie, stanowi około 1-3% wszystkich białek osocza [15,16,22].

AGP wykazuje słabszą zdolność wiązania związków w porównaniu do albuminy, natomiast silniejsze powinowactwo do ligandów, więc dysocjacja cząsteczek z AGP jest trudniejsza niż z albuminy. Białko to wykazuje znaczne powinowactwo do wielu związków egzogennych i endogennych. AGP może wiązać progesteron, hormony steroidowe oraz leki, głównie o charakterze zasadowym, m.in. propranolol i chlorpromazynę. Leki wiążą się z AGP głównie w wyniku oddziaływań hydrofobowych [3,15,16,22].

Zdolność wiązania substancji przez AGP wynika z budowy jej cząsteczki, która składa się w około 45% z węglowodanów o różnej budowie. W strukturze AGP, która nie jest związana z ligandami, dominuje struktura  $\beta$ -harmonijki, natomiast po związaniu substancji dochodzi do zmiany konformacyjnej, w której przeważa struktura  $\alpha$ -helisy [15].

Stężenie AGP w osoczu ulega nawet pięciokrotnemu zwiększeniu w stanach patologicznych, takich jak nowo-

twory, stany zapalne czy infekcje. Powoduje to zmianę ilościową pomiędzy dwiema izoformami AGP, które różnią się między sobą selektywnością wiązania leków. Prowadzi to do wahań stężenia AGP w osoczu, które mogą znacznie zmienić poziom wolnego leku, bez wpływu na jego całkowite stężenie w osoczu [15].

## 2. Wiązanie substancji egzo- i endogennych z białkami osocza

Osocze jest płynną częścią krwi, która stanowi około 55% jej objętości. Składa się w 90% z wody, w 7% z białek, natomiast pozostałe 3% stanowią substancje organiczne oraz nieorganiczne. Osocze transportuje w organizmie elektrolity, białka, składniki odżywcze, produkty przemiany materii oraz leki [15,23]. Wiązanie tych substancji z białkami zależy od:

- pH osocza (zmiana stopnia jonizacji wielu związków kationowych),
- temperatury,
- właściwości fizykochemicznych leku (różne powinowactwo do białek krwi),
- stężenia leku (różne wysycenie miejsc wiążących),
- powinowactwa substancji do miejsc wiążących (różne właściwości fizykochemiczne),
- stężenia białek (zmiana stężenia w wyniku m.in. wydolności nerek i wątroby, wieku),
- obecności innych substancji egzogennych (leki, trucizny) i endogennych (kwasy tłuszczowe, bilirubina, mocznik, hormony) [1,4,21,24-26].

### 2.1. Wiązanie substancji egzogennych z białkami osocza

#### 2.1.1. Leki

Każdy lek, niezależnie od drogi podania, jest transportowany w organizmie przy udziale układu krążenia. Wiązanie leku z białkiem jest nieswoiste oraz odwracalne, a odbywa się głównie w wyniku oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych. W efekcie ten typ oddziaływań międzycząsteczkowych powoduje:

- zwiększoną rozpuszczalność leku w osoczu krwi,
- poprawę lub możliwość transportu leku do tkanki docelowej (szczególnie istotne w przypadku leków hydrofobowych, które są słabo rozpuszczalne w wodnym środowisku krwi),
- mniejszą toksyczność leku,
- ochronę leku przed działaniem związków utleniających,
- przedłużony czas półtrwania środka terapeutycznego *in vivo* [1,27,28].

Związki, które w niewielkim stopniu wiążą się z białkami, charakteryzują się lepszym przenikaniem do tkanek, krótkim czasem krążenia w osoczu oraz szybszą eliminacją z organizmu. Zjawisko wiązania leku z białkami wpływa zarówno na eliminację leku, jaki i na skuteczność, czas działania oraz toksyczność (ryc. 1) [16, 29]. Według najnowszych badań ponad 50% leków wiąże się z białkami osocza w stopniu przekraczającym 90% całkowitego stężenia tych leków [29].

Główne miejsca wiązania leku do albuminy znane są jako I oraz II miejsce wiązania, według nomenklatury Sudlowa. Od związku pierwotnie stosowanego w modelu sondy miejsca te nazywane są również miejscem I dla warfaryny oraz II dla benzodiazepiny. Oba miejsca wiążące posiadają tak zwane kieszenie, złożone z reszt aminokwasowych.

Wnętrze kieszeni ma przede wszystkim charakter niepolarny, jednak zlokalizowane są w nim również dwa niewielkie obszary polarne. Leki wiążą się z regionem hydrofobowym, ale oddziałują również z obszarem polarnym poprzez wiązania wodorowe [6,15,21,30,31].



Ryc. 1. Wpływ wiązania się z białkami osocza na właściwości leku [1,15,30].

Miejsce wiązania Sudlow I ma większe powinowactwo do kwasów dikarboksylovych i dużych związków heterocyklicznych o ujemnym ładunku, znajdującym się w centralnej części lipofilowej struktury (aniony organiczne). W miejscu tym przyłączają się między innymi leki takie jak warfaryna, fenylobutazon i oksyfenbutazon. Miejsce to zawiera tylko jeden obszar o charakterze polarnym, do którego przyłączają się diazepam, ibuprofen czy diflunizal. Swoistość wiązania określona jest przez kształt kieszeni oraz rozkład reszt zasadowych i polarnych. Hydrofobowe łańcuchy na wewnętrznych ściankach są w znacznym stopniu zaangażowane w neutralizację ładunków i interakcję wiązań wodorowych z kwaśnymi lub elektroujemnymi ligandami małowcząsteczkowymi. Wiele ligandów wiąże się do obu miejsc, ale z różnym powinowactwem. Obszar Sudlow I zawiera dużą liczbę pojedynczych miejsc wiązania ligandu, wiąże ligandy o bardzo różnorodnej strukturze chemicznej oraz łatwo się adaptuje [3,15,30,32].

Miejsce wiązania Sudlow II wykazuje większe powinowactwo do małych, aromatycznych kwasów karboksylowych o ładunku ujemnym rozmieszczonym obwodowo. Zawiera sześć helis subdomeny IIIA i budową przypomina miejsce Sudlow I, ale jest od niego znacznie mniejsze [15,30,33]. Wiązanie z ligandem w obszarze Sudlow II zależy od stereoselektywności ligandu [3,34].

### 2.1.2. Inne związki egzogenne

Albuminy mają zdolność do wiązania egzogennych substancji prozapalnych oraz mediatorów stanu zapalnego, takich jak lipopolisacharyd (LPS), kwas lipotejchojowy i peptydoglikan, wykorzystując do tego celu oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Wyżej wymienione związki znajdują się na powierzchni bakterii Gram-ujemnych lub Gram-dodatnich i mają zdolność do aktywacji układu odpornościowego i wywołania stanu zapalnego w organizmie. Ostatnie badania sugerują, iż albumina zgodnie z tym mechanizmem może odgrywać rolę w hamowaniu reakcji zapalnej wywołanej zakażeniem bakteryjnym [35].

## 2.2. Wiązanie związków endogennych z białkami osocza

### 2.2.1. Bilirubina

Albumina pełni również funkcję nośnika dla toksycznych metabolitów, takich jak bilirubina. Bilirubina jest produktem degradacji hemu pochodzącego z hemoglobiny. Albumina posiada w swojej strukturze trzy potencjalne miejsca wiązania bilirubiny: jedno główne w subdomenie IIA oraz drugorzędowe miejsca w subdomenie IB i IIIA [36,37]. Miejsce wiązania dla hemu znajduje się w subdomenie IB [35].

### 2.2.2. Niezestryfikowane długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Albumina jest głównym transporterem niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych w osoczu krwi. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (LCFA) są produktami pośrednimi w metabolizmie lipidów. Stanowią ważny substrat dla procesów metabolicznych, takich jak wytwarzanie energii i synteza lipidów. W układzie krążenia mogą występować w dwóch formach - wolnej i związanej z albuminami. Badania krystalograficzne pozwoliły na precyzyjne określenie miejsc wiązania dla LCFA w trzeciorzędowej strukturze albuminy [36,38].

Albumina posiada siedem miejsc wiązania dla kwasów tłuszczowych o różnym powinowactwie - dwa miejsca o wysokim powinowactwie oraz pięć o średnim powinowactwie. Miejsca te oznaczone są odpowiednio jako FA1-FA7 i znajdują się w subdomenach IIA i IIIA. Obszary FA1-FA5 oddziałują z grupą karboksylową kwasu przez oddziaływania elektrostatyczne lub polarne. Miejsca FA6 i FA7 charakteryzują się mniejszą siłą wiązania [31,35,38].

### 2.2.3. Toksyny mocznicowe

Do związków, które wykazują powinowactwo do albumin, należą również toksyny mocznicowe, takie jak siarczan *p*-krezolu (pCS) oraz siarczan indoksyłu (IS). Substancje te powstają na skutek aktywności jelitowej flory bakteryjnej, jako produkty metabolizmu aminokwasów. Z przewodu pokarmowego wchłaniane są do krwiobiegu, a następnie eliminowane przez nerki [39,40].

W cząsteczce albuminy znajdują się dwa pojedyncze miejsca wiążące te toksyny, pierwsze o wysokim powinowactwie w rejonie Sudlow II) oraz drugie o niskim powinowactwie w rejonie Sudlow I [41]. Wiązanie toksyn mocznicowych z białkami jest wiązaniem odwracalnym, opartym głównie na oddziaływaniach elektrostatycznych i siłach van der Waalsa [42].

### 2.2.4. Inne związki endogenne

Albumina jest drugorzędowym lub trzeciorzędowym nośnikiem dla niektórych substancji lipofilowych, m.in. steroidów, do których należą takie pochodne, jak witamina D i tyroksyna. Związki te mają niskie powinowactwo do wiązania z albuminami, ale ze względu na wysokie stężenie w osoczu, znaczna ich ilość jest przenoszona przez to białko [35,43].

### 2.2.5. Jony metali

Albumina jest zaangażowana również w transport jonów metali, zarówno endogennych, jak i egzogennych, takich jak jony miedzi, niklu, kobaltu, cynku, kadmu i złota, na różnych stopniach utlenienia. HSA posiada cztery czę-

ściowo selektywne miejsca wiązania dla metali. Jony miedzi i niklu wiążą się z albuminą do jej N-końca silniej niż inne metale. N-końcowy fragment albuminy jest najlepiej scharakteryzowanym miejscem wiązania jonów metali.

Ważną rolę w wiązaniu przez albuminę jonów metali odgrywa obszar zawierający cysteinę w położeniu 34 (Cys34). Jest to jedyna cysteina z wolną grupą tiolową, która bierze udział w tworzeniu siedemnastu mostków disiarczkowych. To właśnie Cys34 może wiązać niektóre jony metali (srebra, platyny, rtęci, kadmu, miedzi, złota) na różnych stopniach utlenienia. Ponadto w miejscu tym, dzięki zdolności tworzenia mostków disiarczkowych, przyłącza się 80% całkowitej ilości tlenu azotu (II) z osocza oraz leki tiolowe, cysteina i glutation.

Jony kobaltu (II) mają możliwość wiązania się przynajmniej do trzech miejsc w strukturze albuminy. Główne miejsce wiązania cynku znajduje się na granicy obszarów domeny I i II [31,35,44].

### 3. Wpływ różnych czynników na stężenie związków wiążących się z białkami

#### 3.1. Stan zapalny

Obecność stanu zapalnego w organizmie powoduje zmniejszenie stężenia albuminy (ujemnego białka ostrej fazy) w osoczu nawet o 30-60% w stosunku do wartości fizjologicznej. Zmniejszone stężenie tego białka wpływa na zmianę stężenia wolnej frakcji substancji egzogennych i endogennych, z którymi jest związane [43,45].

#### 3.2. Niewydolność nerek

Niewydolność nerek przez zmianę pH krwi oraz akumulację związków konkurujących z lekami o miejsca wiążące może wpływać na wiązanie leku z albuminami. Ponadto w przebiegu niewydolności nerek dochodzi do nadmiernej utraty albumin przez uszkodzone kłębuszki nerkowe, czego konsekwencją jest zmniejszone stężenie albumin w surowicy [43].

Groźnym następstwem niewydolności nerek jest mocznica, której przyczyną jest gromadzenie się we krwi nadmiaru toksyn mocznicowych, w warunkach fizjologicznych eliminowanych przez nerki. Głównym białkiem wiążącym dla tych związków, zarówno u osób zdrowych jak i u osób z zaawansowaną niewydolnością nerek, jest albumina. Toksyny mocznicowe konkurują z lekami o miejsca wiążące na albuminach, skutkiem czego podczas mocznicy zostaje ograniczona ilość miejsc wiążących dla leku. Oznacza to, że stężenie wolnej frakcji leków jest wyższe u pacjentów z mocnicą w porównaniu do osób zdrowych [39,42,46-48].

#### 3.3. Hipoalbuminemia

Przyczyną zmniejszonej syntezy albumin może być:

- ostra niewydolność wątroby (marskość lub wirusowe zapalenie wątroby),
- stan niedożywienia (w stanach skrajnego niedożywienia dochodzi do niedoboru aminokwasów, takich jak leucyna, arginina, izoleucyna i walina, co może ograniczyć szybkość produkcji albumin),
- zwiększona ucieczka kapilarna albumin (wynikająca ze wzrostu przepuszczalności śródbłonna we wtórnym zapaleniu ogólnoustrojowym) [3,5,28,16,49].

#### 3.4. Choroby wątroby

Choroby wątroby, takie jak marskość wątroby czy wirusowe zapalenie wątroby, prowadzą do niewydolności tego narządu, skutkując zmniejszoną syntezą albumin, a w konsekwencji hipoalbuminemią. Podobnie jak w przypadku chorób nerek, w chorobach wątroby zwiększeniu ulega ilość endogennych substancji w organizmie, np. wolnej frakcji bilirubiny, które konkurują z innymi związkami o miejsca wiązania na albuminach [5,16].

#### 3.5. Hiperbilirubinemia

Zaburzenia transportu i metabolizmu bilirubiny oraz hipoalbuminemia mogą doprowadzić do hiperbilirubinemii, której konsekwencją jest zwiększenie w osoczu frakcji niezwiązanej z białkami, tzw. wolnej bilirubiny (BF) o działaniu neurotoksycznym. W przypadku podwyższonego poziomu bilirubiny w osoczu dochodzi do konkurencji tego metabolitu z lekami o miejsca wiążące w cząsteczkach albumin. W przypadku gdy bilirubina ma wyższe powinowactwo do miejsc wiążących niż lek, wypiera lek z połączeń z albuminami i sama zajmuje miejsca wiążące. Zwiększenie stężenia wolnej frakcji leku w osoczu wynika ze zmniejszonej liczby dostępnych miejsc wiążących dla leku na albuminach [1,30,49].

#### 3.6. Inne leki lub substancje endogenne

W trakcie terapii wielolekowej, podczas równoczesnego podawania leków o podobnych do siebie lub do substancji endogennych właściwościach fizykochemicznych, może dojść do konkurencji o te same lub funkcjonalnie powiązanie miejsca wiązania. Ponadto obserwuje się różne powinowactwo poszczególnych leków do miejsc wiążących z albuminami. Lek lub substancja endogenna o wysokim powinowactwie do miejsc wiążących wypiera inny lek z niskim powinowactwem. W konsekwencji zmniejsza się procent wiązania tej substancji z białkiem. Zjawisko to jest przyczyną występowania interakcji między lekami i może prowadzić do nieproporcjonalnego wzrostu stężenia wolnej frakcji leku [1,50,51].

#### 3.7. Wiek

##### 3.7.1. Młody wiek i okres prenatalny

Ze względu na niski poziom białek w osoczu płodu i noworodka, udział frakcji niezwiązanej z białkami jest wysoki. U kobiet w ciąży oraz u kobiet karmiących piersią wolna forma leku może przenikać przez łożysko lub być wydzielana do mleka. W przypadku leków silnie wiążących się z białkami oraz leków o wąskim indeksie terapeutycznym podwyższone stężenie wolnej frakcji leku w osoczu stanowi niebezpieczeństwo toksycznego wpływu leku na płód lub noworodka [3,5].

##### 3.7.2. Osoby starsze

Zmiany stopnia wiązania leku z białkami osocza mogą również wystąpić u osób w podeszłym wieku. Wynika to z faktu, iż pacjenci w starszym wieku są narażeni na występowanie hipoalbuminemii, a tym samym zwiększone stężenie wolnej frakcji leku. Poziom albumin u osób starszych jest średnio o 19% niższy niż w populacji osób młodych. Związane jest to z nieprawidłową czynnością nerek oraz zaburzeniem zdolności wątroby do syntezy białek. Zwiększone stężenie wolnej frakcji leku może być potencjalną

przyczyną toksyczności i prowadzić do niekorzystnych konsekwencji zdrowotnych, nawet jeśli całkowite stężenie leku mieści się w zakresie terapeutycznym [3,5].

#### 4. Znaczenie wolnej frakcji związków wiążących się z białkami osocza

##### 4.1. Substancje egzogenne - leki

Jedynie lek w formie niezwiązanej z białkami wykazuje aktywność farmakologiczną, ponieważ tylko w takiej postaci może być transportowany przez błony komórkowe, docierać do miejsca docelowego oraz oddziaływać z receptorami. W związku z tym, na efekt terapeutyczny ma wpływ poziom leku niezwiązanego z białkami, a nie całkowite stężenie leku [15,28]. W przypadku leków o wysokim stopniu wiązania z białkami lub o wąskim indeksie terapeutycznym każda zmiana poziomu białka we krwi powoduje zmiany w stężeniu frakcji wolnej. Pewne stany chorobowe, podeszły wiek, interakcje między lekami lub między lekami a substancjami endogennymi mogą spowodować toksyczne działanie leku, w konsekwencji wymuszając konieczność ponownego dostosowania dawki leku (tabela 1) [16,25,28,]. Monitorowanie stężenia frakcji wolnej leku może pomóc w optymalizacji farmakoterapii - zwiększeniu jej skuteczności oraz uniknięciu działań niepożądanych [16].

##### 4.2. Substancje endogenne

###### 4.2.1. Bilirubina

Związanie bilirubiny z albuminą chroni przed jej działaniem neurotoksycznym. Bilirubina niezwiązana z albuminami ma zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg, prowadząc do uszkodzenia komórek nerwowych. Zaburzenia neurologiczne spowodowane przez bilirubinę mogą mieć postać np. łagodnej encefalopatii [37].

Bilirubina związana z białkami może być transportowana do wątroby, gdzie jest sprzęgana i wydalana z organizmu. W warunkach fizjologicznych wiązanie przez HSA bilirubiny hamuje peroksydację lipidów, co stanowi pośrednie działanie antyoksydacyjne [35,36].

###### 4.2.2. Toksyny mocznicowe

Negatywny wpływ toksyn mocznicowych na organizm zależy od stężenia ich wolnej frakcji, która jest aktywna biologicznie oraz może pokonywać bariery biologiczne. Nadmiar toksyn, w stosunku do możliwych miejsc wiązania w strukturze albuminy, powoduje że forma wolna znajduje się w osoczu w wysokim stężeniu. Spowodowana niewydolnością nerek akumulacja toksyn mocznicowych, takich jak pCS oraz IS, prowadzi do pogłębienia dysfunkcji nerek. Ponadto dochodzi do retencji tych związków w całym organi-

zmie [39,42,52]. Wzrost stężenia wolnej frakcji pCS zwiększa ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów z PChN. Natomiast siarczan indoksyłu jest inhibitorem naprawy i regeneracji endotelium. Wzrost frakcji niezwiązanej z białkami tego związku prowadzi do uszkodzeń śródbłonka [39].

##### 4.2.3. Niezestryfikowane długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Duże stężenie niezestryfikowanych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest toksyczne dla komórki. LCFA są słabo rozpuszczalne w wodzie, więc sprzężenie z albuminami umożliwia ich transport w wodnym środowisku osocza krwi oraz czyni je nietoksycznymi. Związanie z albuminami ułatwia wychwytywanie kwasów tłuszczowych przez organy potrzebujące tych substratów. W niewielkiej części kwasy tłuszczowe mogą być również transportowane jako triacyloglicerole lub w postaci lipoprotein, takich jak chylomikrony oraz lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL) [44].

##### 4.2.4. Jony metali

Wiązanie jonów metali z białkami stanowi element bariery antyoksydacyjnej osocza. Mechanizm antyoksydacyjny oparty jest na inaktywacji jonów miedzi i żelaza przez związanie ich z albuminą. Miedź i żelazo należą do metali przejściowych uczestniczących w generacji wolnych rodników [35,19]. Cynk jest podstawowym kofaktorem wielu białek i enzymów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych [44].

#### 5. Metody oznaczania frakcji niezwiązanej z białkami

##### 5.1. Dializa równowagowa

Jest to metoda najczęściej stosowana, uznawana za referencyjną. W komorze dializacyjnej umieszcza się bufor oraz osocze, oddzielone półprzepuszczalną membraną. W poprzek błony następuje rozdział wolnej frakcji analitu od frakcji związanej z białkami. Proces ten wykorzystuje zdolność frakcji wolnej do przenikania przez błonę dializacyjną na zasadzie biernego transportu. Substancja jest transportowana przez półprzepuszczalną membranę do momentu wyrównania się stężeń po obu jej stronach. Stan równowagi ustala się, gdy wolna forma leku osiągnie takie samo stężenie po obu stronach błony [29].

Dializa równowagowa przeprowadzana jest w temperaturze 37°C. Stosuje się bufor fosforanowy o pH równym 7,4 lub sól fizjologiczną buforowaną fosforanami [53]. Szybkość procesu wyrównywania gradientu stężeń po obu stronach

Tabela 1. Wpływ zmiany stężenia frakcji leku niezwiązanej z białkami osocza na działanie leku w ustroju [3,13].

Wzrost stężenia frakcji niezwiązanej z białkami osocza	Zmniejszenie stężenia frakcji niezwiązanej z białkami osocza
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Łatwiejsze osiągnięcie dawki toksycznej</li> <li>• Nasilenie działań niepożądanych</li> <li>• Nasilenie konkurencji o miejsca wiązania</li> <li>• Przyspieszony metabolizm leku</li> <li>• Przyspieszona eliminacja leku</li> <li>• Skrócenie czasu działania leku</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zmniejszenie lub brak skuteczności farmakoterapii</li> <li>• Krótszy czas transportu do tkanki docelowej</li> <li>• Spowolniony metabolizm</li> <li>• Wydłużona eliminacja</li> <li>• Wydłużenie czasu działania</li> </ul>

blony półprzepuszczalnej zależy od czasu potrzebnego do ustalenia się stanu równowagi pomiędzy roztworem np. leku, białka i buforu. Na zjawisko to ma wpływ również szybkość mieszania dializatu oraz wielkość powierzchni błony półprzepuszczalnej [16]. Dializa równowagowa jest techniką czasochłonną, ponieważ średni czas inkubacji wynosi od 2 do 7 godzin [25].

W trakcie dializy równowagowej zachodzi zjawisko osmozy wody przez błonę półprzepuszczalną. Białko w komorze z osoczem zostaje rozcieńczone, a objętość w komorze z buforem odpowiednio się zmniejsza. Jeżeli zmiana objętości wynosi od 15 do 20% należy uwzględnić tę zmianę dokonując korekty objętości. Wyniki badań potwierdzają, że w czasie czterech lub pięciu godzin dializy nie dochodzi do istotnej zmiany objętości, jednak w celu wykluczenia takich zmian zalecany jest dodatek dekstranów (5% w/v) o dużej masie cząsteczkowej (40 000 Da) do komory z buforem [29].

Metoda obciążona jest ryzykiem wystąpienia niespecyficznych wiązań z membraną lub innym materiałem wchodzącym w skład urządzenia. Związki silnie wiążące się z białkami osocza mogą ulegać nieodwracalnej adsorpcji na filtrach membranowych i elementach aparatury z tworzyw sztucznych. Ze względu na możliwość powstawania niespecyficznych wiązań analizowanej substancji z błoną dializacyjną wyniki otrzymane tą metodą należy odnieść do wyników otrzymanych innymi metodami, np. ultrafiltracją [16,29].

Ponadto należy pamiętać, że między dwoma roztworami zawierającymi koloidalne cząsteczki, oddzielonymi błoną półprzepuszczalną, ustala się równowaga Donnana. Zjawisko to polega na nierównomiernym rozmieszczeniu dyfundujących jonów elektrolitu, zależnym od stężeń jonów koloidalnych po obu stronach błony biologicznej. Zjawisku temu można zapobiec poprzez uprzednie rozcieńczenie całego osocza lub użycie buforu o odpowiedniej sile jonowej [54,55].

## 5.2. Ultrafiltracja

Metoda ultrafiltracji stosowana jest w celu odseparowania wolnej frakcji związku od frakcji związanej z białkami osocza. Stosowane w tej metodzie urządzenie do ultrafiltracji posiada dwie komory: górną i dolną, oddzielone od siebie półprzepuszczalną membraną. Rozmiar porów decyduje o możliwościach separacyjnych membrany. Na podstawie różnic w wielkości i kształcie, cząsteczki są rozdzielane na membranie pod wpływem ciśnienia wytworzonego przez siłę odśrodkową. Duże cząsteczki są zatrzymywane przez membranę, natomiast rozpuszczalnik z mniejszymi cząsteczkami zostaje przefiltrowany [16,29].

Zgodnie z procedurą, w górnej komorze urządzenia umieszcza się próbkę osocza, a następnie wiruje z siłą RCF około 2000g. Substancja związana z białkami osocza nie przedostaje się przez membranę, zostaje w górnej komorze, natomiast forma niezwiązana zostaje przefiltrowana przez membranę do przesączu. Stężenie niezwiązanego związku mierzone jest w dolnej komorze urządzenia [16].

Urządzenie do ultrafiltracji często wykorzystuje ten sam typ membrany, który stosowany jest podczas dializy równowagowej, z tym, że zastosowana membrana musi być odporna na ciśnienie występujące podczas filtracji. Podstawą procesu ultrafiltracji jest założenie, że substancja nie wiąże się z błoną, nie dochodzi do przenikania białek

osocza przez błonę, ale membrana jest przepuszczalna dla substancji i wody [16,29].

Do głównych zalet ultrafiltracji można zaliczyć możliwość ilościowego oznaczenia stężenia badanej substancji w przesączu. Jeżeli pH i temperatura procesu są odpowiednio kontrolowane, ultrafiltracja oferuje stosunkowo szybki i prosty sposób na określenie stopnia wiązania z białkami osocza w warunkach fizjologicznych [16].

Główną wadą omawianej metody jest niespecyficzne wiązanie substancji z filtrem membranowym, który zbudowany jest z octanu celulozy. W celu uniknięcia tego zjawiska filtry membranowe nasycy się 5% roztworem Tween 80 (niejonowy środek powierzchniowo czynny) dla leków hydrofobowych i o charakterze kwasowym lub 5% chlorkiem benzalkoniowym dla zasadowych leków (kationowy środek powierzchniowo czynny). Innym sposobem jest silikonowanie, wykonywane poprzez zanurzenie membrany w przesyconym roztworze simetikonu w temperaturze 37°C. Po silikonowaniu, bezpośrednio przed użyciem, należy przepłukać membranę wodą dejonizowaną. Niespecyficzne wiązania mogą również powstawać między analizowaną substancją a tworzywem sztucznym, z którego jest zbudowane urządzenie [29].

W omawianej metodzie, podobnie jak w przypadku dializy równowagowej, może ustalać się równowaga Donnana [16,55].

## 5.3. Ultrawierowanie

Podstawą działania tej metody jest proces wirowania roztworu makrocząstek z siłą odśrodkową wynoszącą około 500 000g. Badany roztwór umieszcza się w próbówce (bez filtra membranowego) i poddaje długotrwałemu procesowi ultrawierowania, od 10 do 24 godzin, w warunkach zbliżonych do warunków fizjologicznych organizmu. Podstawą rozdziału roztworu są różnice w gęstości poszczególnych frakcji [16].

W przypadku próbki osocza, po odwirowaniu rozdziela się ona na trzy różne warstwy: warstwa górna - lipoproteinowa, warstwa środkowa - wodna oraz warstwa dolna - osad białkowy [16,29].

Po odwirowaniu każdą z warstw przenosi się do oddzielnych próbek do analizy. Zakłada się, że ilość substancji znajdującej się w warstwie wodnej stanowi wolną frakcję związku lub jej część. Łączna ilość związku znajdująca się w warstwie lipoproteinowej i białkowej reprezentuje frakcję związaną z białkami [16,29,56].

Niewątpliwą zaletą ultrawierowania jest fakt, iż metoda ta pozwala uniknąć trudności towarzyszących metodom membranowym, takich jak niespecyficzne wiązanie substancji z membraną oraz efekt rozcieńczenia próbki w wyniku osmozy [16,29,56].

Po odwirowaniu, na dnie próbówki, oprócz albumin osadza się również  $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina oraz lipoproteiny. W środkowej warstwie, razem z niezwiązaną frakcją badanej substancji, znajdują się chylomikrony i lipoproteiny o niskiej gęstości. Stanowi to wadę opisanego metody, ponieważ - w przypadku ilościowego oznaczania wolnej frakcji związku - może prowadzić do zawyżonych wyników [16].

Wadą opisanego metody jest również ograniczona liczba próbek, które mogą być jednocześnie wirowane. Co więcej, od kształtu i wielkości związku pozostającego w formie niezwiązanej, zależy czy będzie on ulegał procesowi sedimentacji, w wyniku którego tworzą się większe agre-

gaty badanej substancji. To niekorzystne zjawisko zależy również od temperatury, ponieważ sedymentacja zachodzi intensywniej wraz ze wzrostem temperatury. Rozwiązaniem jest wykonanie analizy kontrolnej, w celu zbadania zjawiska sedymentacji dla badanego związku. Problemem stanowi również możliwość dyfuzji wolnej frakcji związku do warstwy białkowej po zatrzymaniu wirowania [16,29].

Podobnie jak we wcześniej opisanych metodach, tu również istotna jest kontrola temperatury oraz pH, aby badana substancja pozostała stabilna w trakcie procesu [16,29].

#### 5.4. Mikrodializa

Mikrodializa jest techniką analityczną, która pozwala na monitorowanie *in vivo* stężenia wolnej frakcji wielu substancji w próbkach pochodzących z płynów biologicznych, tkanek i narządów. Technika ta oparta jest na dyfuzji biernej związków w poprzek błony półprzepuszczalnej prowadzącej do wyrównania stężeń po jej obu stronach. Powszechnie stosuje się membranę z polieterosulfonu o masie cząsteczkowej 100 kDa.

Istnieje wiele technik, które umożliwiają określenie stężenia niezwiązanej z białkami frakcji związków w płynach biologicznych, ale tylko mikrodializa umożliwia równoczesne pobieranie próbek w organizmie [16,26,29]. Zastosowana metoda pobierania próbek, oparta na zjawisku dyfuzji, pozwala na dostęp do płynu przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wielu różnych tkankach. Podczas pobierania próbek stosowana jest sonda mikrodializacyjna. Sonda posiada wlot przez który podawany jest płyn infuzyjny o niskim natężeniu przepływu ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) oraz wylot, którym płyn opuszcza sondę jako mikrodializat. Ważnym elementem sondy jest niewielka półprzepuszczalna membrana [26,29,56].

Końcówkę sondy mikrodializacyjnej pokrywa półprzepuszczalna membrana, która jest implantowana w naczyniach krwionośnych, tkankach lub narządach, a następnie poddawana perfuzji odpowiednim perfuzatem, przy stałym natężeniu przepływu. Wolna forma leku dyfunduje w poprzek błony dializacyjnej, zgodnie z gradientem stężeń, w kierunku światła sondy lub w kierunku przeciwnym. Zebrane próbki mikrodializatu analizowane są w celu określenia stężenia np. leku w osoczu - frakcji wolnej niezwiązanej z białkami oraz całkowitego stężenia leku [26,29].

#### 5.5. Mikroekstrakcja (SPME)

Mikroekstrakcja do fazy stałej to metoda służąca głównie do pobierania i przygotowywania próbek. Metoda ta jest odmianą ekstrakcji do fazy stałej, w której sorbent nanoszony jest na cienkie włókno. W dozowniku chromatografu gazowego, w wysokiej temperaturze, dochodzi do zjawiska desorpcji analitu z włókien SPME. Za pomocą gazu nośnego analit jest przenoszony do kolumny chromatograficznej. Przy użyciu odpowiedniego detektora chromatografii gazowej (GC) przeprowadza się analizę badanego związku. Związki nietrwałe termicznie ulegają desorpcji pod wpływem odpowiedniego płynu desorpcyjnego, a następnie analizowane są po bezpośrednim wstrzyknięciu do systemu wysokosprawnego chromatografu cieczonego (HPLC) [29].

Należy pamiętać, że podczas analizy frakcji leku niezwiązanej z białkami istotne jest uwzględnienie odpowiedniego pH roztworu, ponieważ wartość pH ma wpływ na po-

wtarzalność metody oraz wiązanie z białkami osocza. W związku z powyższym, w celu kontrolowania pH, badaną próbkę inkubuje się z 10% ditlenkiem węgla ( $\text{CO}_2$ ) lub rozcieńcza się izotonicznym buforem PBS w stosunku 1:10 [29].

Zaletą tej metody jest eliminacja toksycznych rozpuszczalników organicznych używanych w klasycznej wersji ekstrakcji do fazy stałej. Do zalet należy również niewielka objętość próbki, krótki czas analizy, zdolność do bezpośredniego badania złożonych próbek i możliwość zautomatyzowania procesu [29].

#### 5.6. Wysokosprawna analiza czołowa (HPFA)

Jest to nowa metoda analityczna, która umożliwia równoczesne ustalenie całkowitego stężenia leku oraz stężenia jego wolnej frakcji, niezwiązanej z białkami osocza. Stanowi połączenie dwóch metod służących do rozdzielenia związków: wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) oraz wysokowydajnej elektroforezy kapilarnej. HPFA umożliwia prostą analizę po bezpośrednim nastrzyknięciu próbki. W odróżnieniu od konwencjonalnych metod, nie występuje tu zjawisko niespecyficznego wiązania z membraną oraz nie dochodzi do wycieku przez membranę związanego leku. Kombinacja wysokiej wydajności elektroforezy kapilarnej z chiralną kolumną HPLC umożliwia określenie niezwiązanego stężenia badanej substancji i jest szczególnie przydatna np. w badaniu wiązania leków, które są rzadkie i trudne do uzyskania [29].

#### 5.7. Ekstrakcja w punkcie zmętnienia (CPE)

Jest metodą alternatywną dla konwencjonalnych sposobów oznaczania wolnej frakcji związków. Początkowo CPE wykorzystywano głównie do ekstrakcji jonów metali z próbek środowiskowych, natomiast obecnie jest szeroko stosowana w celu selektywnej ekstrakcji związków z różnych nośników biologicznych, ustrojowych i środowiskowych [57,58,59]. Technikę tę można scharakteryzować jako prostą, tanią, przyjazną dla środowiska i stosunkowo szybką, a przy tym wydajną [59].

Metoda oparta jest na zdolności do rozdzielenia faz w wodnych roztworach surfaktantów, zwykle niejonowych (np. Triton X-114). Związki powierzchniowo czynne w roztworach wodnych mogą ulegać agregacji, tworząc wielocząsteczkowe skupiska (micele). Aby nastąpiło zjawisko agregacji związków konieczne jest osiągnięcie przez surfaktant krytycznego stężenia micelnego (CMC) [59,60].

Podczas ogrzewania, w temperaturze określanej punktem zmętnienia, wodny roztwór surfaktantu mętnieje. Powyżej tej temperatury zachodzi podział roztworu na dwie fazy - bogatomielarną, która jest fazą organiczną, gęstą i bogatą w surfaktant oraz fazę ubogomielarną, która jest fazą wodną, z dużo mniejszym stężeniem surfaktantu. Następnie dochodzi do samoczynnego, grawitacyjnego osadzenia cięższych cząstek na dnie próbówki. Proces sedymentacji można przyspieszyć przez wirowanie. W ten sposób możliwe jest uzyskanie rozdzielenia frakcji związanej z białkami oraz wolnej frakcji leku, która znajduje się w fazie ubogomielarnej. W tej fazie analizowane jest ilościowo stężenie wolnej frakcji [59].

Najważniejsze zalety i wady opisanych metod, stosowanych do oznaczania wolnej frakcji związków endogennych oraz egzogennych, przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Najważniejsze zalety i wady metod służących do oznaczania wolnej frakcji związków [25,16,29,54,55,57,61].

Metoda	Zalety	Wady
Dializa równowagowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Powszechnie stosowana</li> <li>• Niedroga</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Czasochłonna</li> <li>• Tylko dla stabilnych związków</li> <li>• Niespecyficzne wiązania z membraną lub innym materiałem wchodzącym w skład urządzenia</li> <li>• Nierównomierne rozmieszczenie dyfundujących jonów elektrolitu</li> <li>• Rozcieńczenie próbki</li> </ul>
Ultrafiltracja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Powszechnie stosowana</li> <li>• Prosta i szybka</li> <li>• Stosowana dla niestabilnych związków</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niespecyficzne wiązania z membraną lub innym materiałem wchodzącym w skład urządzenia</li> <li>• Nierównomierne rozmieszczenie dyfundujących jonów elektrolitu</li> <li>• Kontrola pH i temperatury</li> </ul>
Ultrawirowanie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brak niespecyficznych wiązań analitu z membraną</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Długi czas przygotowania próbki</li> <li>• Stosowana dla stabilnych związków</li> <li>• Kontrola pH i temperatury</li> <li>• Sedymentacja cząstek z rozdzielonych warstw na dno próbówki</li> <li>• Interferencje w wyniku obecności LDL</li> </ul>
Mikrodializa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Badanie <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uszkodzenie tkanek spowodowane implantacją sondy</li> </ul>
Mikroekstrakcja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prosta</li> <li>• Krótki czas analizy</li> <li>• Mała objętość próbki</li> <li>• Możliwość zautomatyzowania</li> <li>• Możliwe bezpośrednie badanie złożonych próbek</li> <li>• Nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Długi czas desorpcji</li> <li>• Kontrola pH</li> </ul>
Wysokosprawna analiza czołowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brak niespecyficznych wiązań analitu z membraną</li> <li>• Krótki czas analizy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wysoki koszt aparatury</li> </ul>
Ekstrakcja w punkcie zmętnienia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedroga</li> <li>• Przyjazna dla środowiska</li> <li>• Bezpieczna - bez toksycznych rozpuszczalników organicznych</li> <li>• Prosta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wpływ surfaktantu na proces jonizacji podczas oznaczania metodą LC-MS/MS</li> </ul>

## 6. Wykaz skrótów

AGP	( <i>α-1-acid glycoprotein</i> ) $\alpha$ -1-kwaśna glikoproteina	GC	( <i>Gas chromatography</i> ) Chromatografia gazowa
BF	( <i>Free bilirubin</i> ) Wolna bilirubina	HPFA	( <i>High performance frontal analysis</i> ) Wysokosprawna analiza czołowa
CMC	( <i>Critical micelle concentration</i> ) Krytyczne stężenie micelarne	HPLC	( <i>High performance liquid chromatography</i> ) Wysokosprawna chromatografia cieczowa
CPE	( <i>Cloud pint extraction</i> ) Ekstrakcja w punkcie zmętnienia	HSA	( <i>Human serum albumin</i> ) Ludzka albumina surowicy
ESI	( <i>Electrospray ionization</i> ) Elektrozpylanie	IS	( <i>Indoxyl sulphate</i> ) Siarczan indoksyłu



LC-MS/MS	( <i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i> ) Tandemowa spektrometria mas sprzężona z chromatografią ciecząową
LPS	( <i>Lipopolysaccharide</i> ) Lipopolisacharyd
LCFA	( <i>Long-chain fatty acids</i> ) Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe
pCS	( <i>p-Cresol sulphate</i> ) Siarczany p-krezolu
PChN	Przewlekła choroba nerek
RCF	( <i>Relative centrifugal force</i> ) Względna siła odśrodkowa
SPME	( <i>Solid-phase microextraction</i> ) Mikroekstrakcja do fazy stałej
VLDL	( <i>Very low density lipoprotein</i> ) Lipoproteiny o bardzo małej gęstości

## 7. Bibliografia

- Kratz F., Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2), 429-445.
- Fan J., de Lannoy I. A. M.: Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 87, 93-120.
- Dasgupta A., Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 377(1-2), 1-13.
- Riccardi K., Cawley S., Yates P. D., Chang C., Funk C., Niosi M., Lin J., Di L. Plasma Protein Binding of Challenging Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104 (8), 2627-2636.
- Valerio C., Theocharidou E., Davenport A., Agarwal B. Human albumin solution for patients with cirrhosis and acute on chronic liver failure: Beyond simple volume expansion. *World Journal of Hepatology*, 2016, 8(7), 345-354.
- Yang F., Zhang Y., Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3), 3580-3595.
- Stegmayr B., New insight in impaired binding capacity for albumin in uraemic patients. *Acta Physiologica*, 2015, 215(1), 5-8.
- Simonsen K., Rode A., Nicoll A., Villadsen G., Espelund U., Lim L., Angus P., Arachchi N., Vilstrup H., Nexø E., Grønbaek H. Vitamin B12 and its binding proteins in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2014, 49(9), 1096-1102.
- Tran M.T., Stürup S., Lambert I. H., Gammelgaard B., Furger E., Alberto R. Cellular uptake of metallated cobalamins. *Metallomics*, 2016, 8, 298-304.
- Gkouvasos K., Papanikolaou G., Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820(3), 188-202.
- Pappa T., Ferrara A. M., Refetoff S. Inherited defects of thyroxine-binding proteins. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 29(5), 735-747.
- Zhivkova Z.D., Studies on drug-human serum albumin binding: the current state of the matter. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21(14), 1817-1830.
- Senis Y., Garcia-Alonso A. Platelet Proteomics: Principles, Analysis, and Applications, WILEY, Canada, 2011.
- Andersen M.M., Leucocyte-Associated Plasma Proteins. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1982, 15 (4), 399-407.
- Lambrinidis G., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 86, 27-45.
- Bohnert T., Gan L. S. Plasma protein binding: From discovery to development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102, 2953-2994.
- Lee P., Wu X. Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Current pharmaceutical design*, 2015, 21(14), 1862-1865.
- Anraku M., Shintomo R., Taguchi K., Kragh-Hansen U., Kai T., Maruyama T., Otagiri M. Amino acids of importance for the antioxidant activity of human serum albumin as revealed by recombinant mutants and genetic variants. *Life Sciences*, 2015, 134, 36-41.
- Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *Febs Letters*, 2008, 582(13), 1783-1787.
- Larsen M. T., Kuhlmann M., Hvam M. L., Howard K. A. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies*, 2016, 4, 3.
- Zhu L., Yang F., Chen L., Meehan E. J., Huang M. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug-drug interaction studied by X-ray crystallography. *Journal of Structural Biology*, 2008, 162(1), 40-49.
- Kopecký V. Jr., Ettrich R., Hofbauerová K., Baumruk V. Structure of human alpha1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 300(1), 41-46.
- Solomon E. P., Berg L., Martin D. *Biologia*, Warszawa, Multico, 2013.
- Smith D. A., Di L., Kerns E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9, 929-939.
- Peltenburg H., Bosman I. J., Hermens J. L. M. Sensitive determination of plasma protein binding of cationic drugs using mixed-mode solid-phase microextraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 115, 534-542.
- Zeitlinger M. A., Derendorf H., Mouton J. W., Cars O., Craig W. A., Andes D., Theuretzbacher U. Protein Binding: Do We Ever Learn? *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 2011, 55(7), 3067-3074.
- Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1295 (2), 147-157.
- Dawidowicz A. L., Kobielski M., Pieniadz J. Anomalous relationship between free drug fraction and its total concentration in drug-protein systems: I. Investigation of propofol binding in model HSA solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 34(1), 30-36.
- Zhang F., Xue J., Shao J., Jia L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discovery Today*, 2012, 17(9-10), 475-485.
- Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 353(1), 38-52.
- Trynda-Lemiesz L., Wiglusz K., Mucha I. The role of albumin in the diagnostics. Binding of ions and metal complexes. *Wiadomości Chemiczne*, 2010, 64(1-2), 81-104.
- Cui Y. F., Bai G. Y., Li C. G., Ye C. H., Liu M. L. Analysis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34(2), 247-254.
- Zsila F., Bikadi Z., Malik D., Hari P., Pechan I., Berces A., Hazai E. Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics*, 2011, 27(13), 1806-1813.
- Shen Q., Wang L., Zhou H., Jiang H.D., Yu L. S., Zeng S. Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013, 34(8), 998-1006.
- Arroyo V., Garcia-Martinez R., Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *Journal of hepatology*, 2014, 61(2), 396-407.
- Merlot A. M., Kalinowski D. S., Richardson D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein. *Frontiers in physiology*, 2014, 5, 299.
- Novotná P., Urbanová M. Bilirubin, model membranes and serum albumin interaction: The influence of fatty acids. *Biochimica et biophysica acta*, 2015, 1848 (6), 1331-1340.
- van der Vusse G.J., Albumin as fatty acid transporter. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2009, 24(4), 300-307.

39. Vanholder R., Van Laecke S., Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(8), 1211-1221.
40. Evenepoel P., Meijers B. K., Bammens B. R., Verbeke K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney International. Supplement*, 2009, 114, 12-19.
41. Watanabe H., Noguchi T., Miyamoto Y., Kadowaki D., Kotani S., Nakajima M., Miyamura S., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metabolism & Disposition*, 2012, 40(7), 1423-1428.
42. Devine E., Krieter D. H., R uth M., Jankovski J., Lemke H. D. Binding affinity and capacity for the uremic toxin indoxyl sulfate. *Toxins*, 2014, 6(2), 416-429.
43. Nicholson J. P., Wolmarans M. R., Park G. R. The role of albumin in critical illness. *British Journal of Anaesthesia*, 2000, 85(4), 599-610.
44. Francis G.L., Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*, 2010, 62(1), 1-16.
45. Macia zek-Jurczyk M., Szkudlarek-Ha nik A., Siek D., Chtosta M., Faruga K., Moskata W., Sutkowska A. Binding of ketoprofen to plasma protein in inflammatory states. *Annales Academiae medicae silesiensis*, 2002, 66(3), 27-33.
46. Załuska W., Water as a uraemic toxin? *Forum Nefrologiczne*, 2010, 3(1), 12-17.
47. Viaene L., Annaert P., de Loor H., Poesen R., Evenepoel P., Meijers B. Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2013, 34(3), 165-175.
48. Otagiri M., A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2005, 20(5), 309-323.
49. Clarke D. F., Wong R. J., Wenning L., Stevenson D. K., Mirochnick M. Raltegravir in vitro effect on bilirubin binding. *The pediatric infectious disease journal*, 2013, 32(9), 978-980.
50. Bai G., Cui Y., Yang Y., Ye C., Liu M. A competitive low-affinity binding model for determining the mutual and specific sites of two ligands on protein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38(4), 588-593.
51. Ascenzi P., Fanalib G., Fasanob M., Pallottinic V., Trezzac V. Clinical relevance of drug binding to plasma proteins. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1077(6), 4-13.
52. Stegmayr B., Uremic toxins and lipases in haemodialysis: a process of repeated metabolic starvation. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(5), 1505-1511.
53. Curran R. E., Claxton C. R., Hutchison L., Harradine P. J., Martin I. J., Littlewood P. Control and Measurement of Plasma pH in Equilibrium Dialysis: Influence on Drug Plasma Protein Binding. *Drug Metabolism & Disposition*, 2011, 39(3), 551-557.
54. Fogh-Andersen N., Bjerrum P. J., Siggaard-Andersen O. Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH. *Clinical Chemistry*, 1993, 39(1), 140-152.
55. Bolton G. R., Boesch A.W., Basha J., Lacasse D. P., Kelley B. D., Acharya H. Effect of protein and solution properties on the donnan effect during the ultrafiltration of proteins. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(1), 140-152.
56. Gonzalez D., Schmidt S., Derendorf H. Importance of Relating Efficacy Measures to Unbound Drug Concentrations for Anti-Infective Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2), 274-288.
57. Rukhadze M. D., Tsagareli S. K., Sidamonidze N. S., Meyer V. R. Cloud-point extraction for the determination of the free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva. *Analytical Biochemistry*, 2000, 287(2), 279-283.
58. Samaddar D., Sen K. Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2014, 20(4), 1209-1219
59. Biparva P., Matin A. A. Microextraction Techniques as a Sample Preparation Step for Metal Analysis. *Atomic Absorption Spectroscopy*, InTech, 2012, 61-88.
60. Afkham A., Madrakian T., Siampour H. Flame atomic absorption spectrometric determination of trace quantities of cadmium in water samples after cloud point extraction in Triton X-114 without added chelating agents. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 138(2), 269-272.
61. Giebutowicz J., Kojro G., Bu -Kwa nik K., Rudzki P. J., Marszałek R., Le  A., Wroczyński P. Cloud-point extraction is compatible with liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for the determination of bisoprolol in human plasma. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1423, 39-46.