

اندازه گیری داروی آزاد در خون و اهمیت کلینیک آن

xx دکتر بهرام فتح اله زاده

x دکتر عباسعلی اطمینانی

x دکتر مهین زهرائی

مقدمه

و آنیونیک (Anionic) مانند وارفارین، فنی توئین (Phenytoin)، اسید والپروئیک (Valproic acid) (۲۴).

مطالعات سالهای اخیر موید آنست که داروهای کاتیونیک (Cationic) مانند پروپرانولول کینیدین (Propranolol Quinidie) و آنتی دپرسانهای تری سیکلیک (Tricyclic antidepressants) علاوه بر آلبومین به پروتئین های دیگری مانند α_1 -اسید گلیکوپروتئین AAG یا α -acid glycoprotein (ولپوپروتئین ها نیز متصل میشوند (۴-۴۸) و در بعضی مواد میزان اتصال آنها به ترکیبات نامبرده حتی بیشتر از آلبومین میباشد، بنابراین بدیهی است که تغییرات AAG و بعضی از لیپوپروتئین های خون مانند LDL (Low Density Lipoprotein) بر میزان فراکسیون متصل به پروتئین داروها موثر واقع شود (۵۸-۳۴-۴۸).

داروها به دو شکل در خون جریان می یابند: دسته اول آنها یک متصل به ترکیباتی مانند پروتئین ها، گلوبولهای قرمز و یا پلاکت ها میباشد و گروه دیگر داروهای هستند که بدون اتصال به ترکیبی در مایع پلاسما حل میشوند (۲۸-۳۰). میزانی از دارو که به پروتئین متصل میشود (Protein-bound Fraction) بسته بنوع دارو متفاوت است، بطوریکه بین حداقل ۱/۵ برای کافئین و اتوسوکس ایمید (Ethosuximide) و حداکثر به ۹۹/۵ برای وارفارین (Warfarin) و دیکومرول (Dicumerol) میباشد (۵۲). هر نوع تغییری در میزان فراکسیون متصل به پروتئین دارو نسبت به فراکسیون آزاد و متابولیسیم داروها فقط در مورد داروهای که درصد اتصال آنها به پروتئین زیاد است (بیش از ۸۰٪) با اهمیت تلقی میشود. آلبومین از نظر کمی مهمترین پروتئینی است که به بسیاری از داروها متصل میشود مخصوصاً " به داروهای خنثی

x - دپارتمان بیوشیمی دانشکده پزشکی تهران.

xx+ پاتولوژی و آزمایشگاه بالینی - بیمارستان امام خمینی.

اتصال به پروتئین دارای اثرات مهمی روی خاصیت فارماکوکینتیک (Pharmacokinetics) داروها می‌باشد و تغییر مقدار آن بستگی به خصوصیات دفعی آنها دارد، داروهایی که از طریق کلیه دفع میشوند و یا دارای جذب پسوبندی می‌باشند فقط فراکسیون آزاد آنها از طریق این اعضا دفع میشوند بنابراین دارای دفع محدود می‌باشند و میزان آن بستگی به مقدار درصد اتصالشان به پروتئین دارد، داروهایی که از فراکسیون آزاد بالایی برخوردارند، میزان دفع آنها نیز زیاد و نیمه عمر کوتاهتری داشته و تغییرات ماکزیم (Peak) آنها نیز بیشتر است. به عنوان نمونه میتوان از داروهایی مانند تئوفیلین و وارفارین به عنوان داروهای با دفع محدود (Restrictively cleared) نام برد که میزان دفع آنها بترتیب ۰/۷ و ۰/۵۵ ml/min/Kg بوده و بستگی به فراکسیون آزاد آنها (بترتیب ۰/۶۲ و ۰/۰۱) دارد (۵۷). در مورد داروهایی مانند لیدوکائین و پروپرانولول که دارای میزان دفعی نامحدود (Non-restrictively cleared) می‌باشند، دفع آنها تحت مکانیسم فعالی که بستگی بمقدار فراکسیون آزاد، و فرم متصل به پروتئین و مقدار آزاد دارد و همچنین میزان خونی که در عضو جریان دارد از طریق کبد و یا کلیه انجام میشود (۴۹-۶۱).

دوام خواص فارماکولوژیکی دارو در خون بمقدار قابل توجهی وابسته به اتصال آن به پروتئین می‌باشد در صورتیکه بخش آزاد براحتی از مویرگها و غشاء سلولها عبور مینماید و بنظر میرسد بخش فعال دارو در بدن موجودزنده همان فراکسیون آزاد دارو باشد. معذالک این موضوع نیز اخیراً با مطالعه بر روی داروهای لیپوفیل مانند لیدوکائین و پروپرانولول و بعضی از هورمونها مورد تردید واقع شده است.

و بالاخره آزمایشاتی نیز موید عبور فراکسیون متصل به پروتئین (گلبولین) داروهایی مانند لیدوکائین، و پروپرانولول از نسج مغز می‌باشد (۲۴). معذالک بعلت اطلاعات محدودی که از نحوه تبادل دارو در پلاسما موجود است قسمت اعظم توجه معطوف به علائم بالینی و اندازه‌گیری میزان آزاد - دارو در سرم و یا پلاسما، که معرف خواص درمانی در بیمار است می‌باشد. و همچنین باید به تاثیر فاکتورهای پاتوفیز-یولوژی و پارامترهای تجربی که در میزان اتصال دارو به

پروتئین موثر می‌باشند توجه نمود.

در این مطالعه سه موضوع مورد توجه قرار گرفته است: - بررسی اصول دو روش اندازه‌گیری دارو و عوامل موثر در آنها.

- بررسی تغییرات میزان اتصال دارو به پروتئین ها و اثراتش روی متابولیسم و خواص فارماکولوژیکی دارو.

- بررسی اثرات کلینیکی تغییرات میزان داروی متصل شده به پروتئینها و بالاخره کاربرد کلینیکی اندازه‌گیری داروی آزاد.

روشهای اندازه‌گیری:

روشهای متعددی جهت مطالعه و اندازه‌گیری میزان فراکسیونهای متصل به پروتئین و آزاد داروها مانند تعادل دیالیز (Equilibrium dialysis) و اولترافیلتراسیون (Ultrafiltration)، اولتراسانتریفوگاسیون (Ultracentrifugation) و ژل فیلتراسیون (Gel-filtration) و رادیوایم-ونواسی (Radioimmunoassay) (۲۴-۸) وجود دارد که تمام روشهای ذکر شده براساس جداسازی قسمت آزاد دارو از بخش متصل به پروتئین آن می‌باشد، در این گردآوری روش تعادل دیالیز (E.D) و فیلتراسیون که در آزمایشگاههای تحقیقی بیشتر متداول است، توضیح داده میشود.

روش تعادل دیالیز

در این روش از شامبر (Chamber) حاوی تامپونی که بوسیله غشایی نیمه تراوا بدو قسمت شده استفاده میشود، غشاء نسبت به مولکولهای کوچک دارو تراوا و به پروتئین و بالاخره داروی متصل به پروتئین غیر قابل تراواست، بنابراین مولکول آزاد دارو (بخش آزاد) با عبور از غشاء می‌خواهد با بخش داروی متصل به پروتئین بحال تعادل درآید. در این روش با قرار دادن سرم یا پلاسما در یکطرف شامبر بعد از برقراری تعادل مقدار داروی موجود در طرف دیگر (Dialysate=D) نشان دهنده غلظت داروی آزاد است که معادل داروی متصل به پروتئین (Retentate=R) که در طرف اول باقیمانده است می‌باشد. باتوجه به شرایط آزمایش مانند حرارت، PH، زمان و ترکیب تامپون با این روش ممکن است نتایج دقیقی حاصل

روش اولترافیلتراسیون:

اساس این روش بر مبنای فشاری است که در اثر سانتریفوگاسیون ایجاد میشود در نتیجه آب، و مولکولهای دارو از یک غشاء نیمه تراوا عبور میکنند، روشی است ساده و سریع، سرعت آن دارای اهمیت است زیرا طولانی بودن روش سبب میشود اسیدهای چربی که در اثر لیپولیز ایجاد میشوند با داروها ترکیب شده در نتیجه سبب کاهش مقدار داروی متصل به پروتئین شود (۴۲). میزان فشار بر مقدار دارویی که از غشاء عبور میکند موثر است و بهترین دور سانتریفوگاسیون (۲۰۰۰-۱۰۰۰ xKJ) میباشد.

در این روش نیز مانند روش قبل عواملی مانند pH، درجه حرارت، نوع غشاء و تعادل دو نان را باید در نظر داشت.

عوامل موثر بر میزان اتصال دارو به پروتئین:

عوامل فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی بر روی مقدار اتصال دارو به پروتئین و بالاخره فراکسیون آزاد دارو و در نتیجه دفع آن موثر واقع میشوند.

عوامل فیزیولوژیک:

اثر جنس: در مورد اثر جنس بر روی میزان اتصال دارو به پروتئین مطالعات محدودی وجود دارد، معذالک در مورد داروهای ایمنی پر آمین (۳۱) فراکسیون متصل به پروتئین در خانمها کمتر از جنس مذکر میباشد و در کلردی آزپوکساید (۵۳) و در نیترازپام (۲۷) اختلاف کم ولی از نظر آماری معنی دار است، در دیازپام نتایج مغایر یکدیگرند (۶۳) ولی در لیدوکائین (۵۴) ولورازپام (۶۴) و اکسازپام (۲۴) و پروپرانولول (۶۳) اختلافی بین مردان و خانمهای غیر باردار موجود نیست در صورتیکه در خانمهایی که داروهای ضد بارداری مصرف میکنند نسبت به آنهاستیکه مصرف نمیکند میزان فراکسیون متصل به پروتئین داروهای کلردیازپوکساید، لیدوکائین و دیازپام کمتر میباشد.

بارداری یکی از تغییرات فیزیولوژیکی است که اثرات مهمی بر روی متابولیسم داروها دارد، تغییرات پروتئین های سرم، اسیدهای چرب آزاد و سایر مواردی که بر روی ظرفیت میزان اتصال دارو و همچنین افزایش فراکسیون آزاد دارو در بیمارانی که ماههای آخر بارداری را میگذرانند

شود. علاوه بر شرایط آزمایش جهت رسیدن به نتایج دقیق و قابل استفاده به نکات زیر نیز باید توجه کرد:

— اختصاصات تعادل دو نان، خواص اسموتیک محلول، جذب غیر اختصاصی داروی آزاد و یا کمپلکس دارو، پروتئین به غشاء دیالیز، فقدان رسیدن به تعادل سناخالصی، های رادیوشیمیگال، عبور احتمالی پروتئین از غشاء. — تعادل دو نان در اثر انتشار غیر مساوی یونها، یا مولکولهای آزاد دارو در دو طرف غشاء نیمه تراوا تحت تاثیر مولکولهای داروی متصل به پروتئین که غیر قابل انتشار از غشاء میباشد حاصل میشود و اثر تعادل دو نان در اندازه گیری داروها بروش E.D کاملاً مشخص شده است بخصوص در مورد داروهاییکه بمقدار زیاد یونیزه میشوند و کمتر بصورت متصل به پروتئین میباشد، بنابراین اثر تعادل دو نان را با افزودن الکترولیت های قابل انتشار (ClNa-ClK) و رساندن pH محلول تا نزدیک pH ایزوالکتریک پروتئین میتوان تقلیل داد، در این مورد نیز باید توجه کرد که داروی، متصل به پروتئین در pH نزدیک به ایزوالکتریک رسوب ننموده و الکترو-ولیتی هم که بمحلول اضافه میشود با دارو ایجاد ترکیبی ننماید.

— فشار اسمتیک پلاسما ممکن است سبب تغییر قابل ملاحظه ای در حجم R در تعادل نهایی گردد، با توجه به اینکه تعیین دقیق حجم R مشکلتر از غلظت پروتئین میباشد از اینرو محاسبه میزان اولیه پروتئین پلاسما و پروتئین R عدد صحیح رقت پروتئینی محلول R را مشخص میکند.

— مقداری از داروی آزاد و کمپلکس دارو و پروتئین ممکن است در حین آزمایش جذب غشاء و یا دستگاه دیالیز شوند و این مقدار به غلظت دارو و درجه یونیزاسیون آن نیز بستگی دارد بطوریکه در استریتومایسین تا ۵۰% میرسد، با استفاده از بلانک این مسئله را باید تصحیح کرد.

— فاکتورهای دیگری مانند درجه حرارت، pH و تانمپون نیز بطور محسوسی در تعیین مقدار داروی متصل به پروتئین و بالاخره فراکسیون آزاد دارو و در محیط خارج موثرند و بطور کلی فراکسیون متصل به پروتئین دارو در درجات حرارت بالا کاهش می یابد، بطوریکه در حرارت ۳۷ درجه مقدار تئوفیلین حدود ۸/۹% و کینیدین ۶% کمتر از درجه حرارت ۲۵ میباشد (۵۷-۶۲).

متصل به پروتئین داروهایی مانند کینیدین (۱)، پروپرانولول (۶۴)، بنزودیازپین ها (۳۲) و وراپامیل، بالاخص فنی - توئین (۱۰) که در هیپاتیت حاد ویروسی و بیماریهای الکلیک کبدی نیز کاهش می‌یابند.

اثر نارسایی های کلیوی در کاهش میزان داروهای متصل به پروتئین بقدر کافی مطالعه شده است و داروهایی که به این علت بیشتر تحت تاثیر قرار می‌گیرند اکثراً " از نوع آنیونیک و خنثی میباشند مانند فنی توئین، اسیدوالپورتیک (۲۲)، فنوباریتال، فنیل بوتازون، سالیسیلات، تیروکسین، وارفارین (۱۱) میباشند، داروهای کاتیونی مانند پروپرانولول (۳۶)، کینیدین (۴۷) و وراپامیل (۳۳)، که به AAG و لیپو پروتئین ها متصل میشوند، در بیماریهای کلیوی کمترین تغییر را مینمایند. براساس مطالعات انجام شده بنظر میرسد بیمارانی که در اثر سندرم نفروتیک دارای کاهش میزان داروی متصل به پروتئین میباشند، این کمبود در اثر اختلاف کیفی مولکول آلبومین میباشد که در نتیجه آن مولکولهای دیگر جایگاههای دارو را در روی آلبومین اشغال مینمایند.

آسیب های حاد نسوج باعث افزایش تعدادی از پروتئین ها مانند آلفا اسید گلیکوپروتئین (AAG) و لیپو- پروتئین میشوند که به آنها Acute phase reactants میگویند، در نتیجه داروهای کاتیونی مانند لیدوکائین، پروپرانولول، کینیدین، ایمی پرامین، و دیلتازم (Diltiazem) که علاوه بر آلبومین به پروتئین های نامبرده نیز متصل میشوند، افزایش محسوسی را در مقدار فراکسیون متصل به پروتئین نشان میدهند (۳۴-۴۸) بنابراین افزایش پروپرانولول، لیدوکائین، دیزوپیرامید و ایمی پرامین بعد از انفارکتوس حاد میوکاردی (۱۹-۵۱) و کینیدین و پروپرانولول بعد از جراحی (۱۸) بدلیل فوق میباشد.

اثر وابستگی غلظتی داروها؛

اکثر داروها در میزانی که جهت درمان بکار میروند قادر به اشباع ظرفیت تام پروتئین ها از دارو نمیشوند، باستثنای اسیدوالپورتیک (۱۲)، سالیسیلات (۲۰) و دیزوپیرامید (۵-۳۵) که بعلاوه اشباع بخش پروتئینی افزایش مقدار دارو سبب افزایش میزان فراکسیون آزاد دارو میشود بطوری که در مواقعی که مقدار اسیدوالپورتیک در پلاسما بین ۳۰ تا ۱۶۰ $\mu\text{g/ml}$ میباشد فراکسیون آزاد از ۰/۰۵

در مقایسه با خانمهای غیر باردار مورد مطالعه قرار گرفتند (۴۴). بطوریکه در فنی توئین ۲۰-۱۰٪، فنوباریتال ۱۲٪، اسید والپورتیک ۵۵٪، دیازپام ۶۲-۱۴۴، لیدوکائین ۵۰٪، واسید سالیسیلیک ۸۰٪ گزارش شده است (۱۳-۴۶) فراکسیون آزاد بعضی از داروها مانند لیدوکائین (۶۳)، بی پی واکائین (۴۵)، مپریدین (۴۱)، و پروپرانولول (۶۳)، در خون بندناف بمراتب بیش از خون مادر است. و همچنین با توجه به اینکه غلظت AAG در خون مادر به مراتب بیش از جنین است (۲۷)، بنابراین اساس اختلاف بین میزان دارو- هائی است که باین ترکیب متصل میشوند، داروهائی مانند دیازپام (۳۹) اسیدوالپورتیک (۴۰)، فنوباریتال، فنی توئین و سالیسیلات ها (۲۶) که به آلبومین متصل میشوند، فراکسیون آزاد آنها در خون جنین کمتر است و این شاید به دلیل بالا بودن غلظت آلبومین در پلاسما جنین است (۲۶). ولی در نوزادان بعلاوه شرایط متفاوت آلبومین گرایش کمتر (Affinity) نسبت به اتصال به دارو در جهت عکس و میل ترکیب بیشتر به بیلی روبین، میزان فراکسیون داروی متصل به پروتئین کم میباشد میزان بالای اسیدهای چرب آزاد در خوی مادر بطور رقابتی سبب آزاد، شدن دارو از جایگاههای آلبومین و انتقال بیشتر آن از طریق پلاستنتا میشود، بهمین دلیل است که مقدار داروی تام در هنگام زایمان در نوزاد بیش از مادر است (۵۰-۲).

در بیماریهای ناشی از کهولت، کاهش میزان داروی متصل به پروتئین در ارتباط با کاهش آلبومین پلاسما میباشد. که این حالت در اشخاص مسن و آنها که دچار فقر غذایی هستند نیز دیده میشود.

عوامل پاتولوژیکی:

بیماریهای زیادی بر روی مقدار فراکسیون متصل به پروتئین دارو، اثر میگذارند، بطوریکه داروهائی که به آلبومین متصل میشوند در بیماریهای کبدی، نارسایی های دستگاه ادراری، سندروم نفروتیک در آنتروپاتی هاییکه منجر به از دست دادن پروتئین میشوند و سوختگیها که با هیپوآلبو- نمیا همراه هستند، سبب کاهش مقدار فراکسیون متصل به پروتئین دارو میشوند. کاهش آلبومین در بیماریهای کبدی به دو دلیل ایجاد میشود: یکی انتشار در فضای بین نسجی و دیگری اختلال در سنتز آن میباشد که در رابطه با آن فراکسیون

است، بنظر میرسد تداخل عمل این دو دارو بیش از یک جایجایی ساده باشد زیرا افزایش همزمان مقدار فراکسیون آزاد و نیمه عمر ناپدید شدن آن موید اثر مهارکنندگی متابولیسم اسید والپروئیک بوسیله سالیسیلات میباشد (۴۳). وارفارین دارویی است ضد انعقاد که بمقدار زیادی به پروتئین اتصال می‌یابد و بوسیله فنیل بوتازون و داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی و عوامل مسکن مانند آزاپروپازون (Asapropazone) اسید مفنمیک (Mefenamic acid) ناپروکسن (Naproxen) ایندومتاسین (Indomethacin)، کتوپروفن (Ketoprofen) ایبوروفن (Ibuprofen) (۳۸) در روی پروتئین جایجا میشود ولی در غلظت درمانی فقط آزاپروپازون و فنیل بوتازون باعث مشخص شدن علائم کلینیکی پروتئینه شدن دارو و اثر ضد انعقادی آن میشوند (۳۸-۱۶).

در مورد جایجایی داروهای کاتیونیک که علاوه بر آلبومین به AAG - اسید گلیکوپروتئین نیز متصل میشوند، گزارشات کمتری شده است، شاید باین دلیل باشد که داروهای کاتیونیک دارای ظرفیت بالای اتصال به آلبومین ولی با افینیت کم میباشند و همچنین دارای قدرت انتشار زیادی هستند در نتیجه غلظتشان در پلاسما معمولاً کم است و به چند پروتئین مانند آلبومین، AAG و لیپوپروتئین‌ها اتصال یافته‌اند، بنابراین جایجایی دارو از یک پروتئین اثر قابل اندازه گیری در فراکسیون آزاد، و در قسمت جایجا شده نمیگذارد. بهمین دلیل اگر این تصور موجود باشد که دیزوپرامید سبب جایجایی لیدوکائین و پروپرانولول از AAG میشود، این جایجایی در سرم علامتی جهت بررسی نشان نمیدهد (۳۷) در مورد جایجایی سایر داروهای کاتیونیک مانند میپریدین و بویی واکائین و میریدین و لیدوکائین (۲۳) و بویی واکائین و میواکائین نیز مطالعاتی شده است. بعضی مواد مانند اسیدهای چرب آزاد و بیلی روبین که در داخل بدن تولید میشوند در شرایطی که مقدارشان زیاد گردد، محل دارو را در روی پروتئینها اشغال میکنند. بررسیهایی در این مورد موید آنست که افزایش بیلی روبین در پلاسما ارتباط مثبتی با افزایش فراکسیون آزاد فنی توئین و دیازپام دارد (۱). هپارین لیپوپروتئین لیپاز را (که باعث تجزیه شیلومیکرونها میشود) فعال میکند. آزمایشات نشان داده که تجویز حدود ۱۰۰ واحد هپارین سبب افزایش

به ۲۵٪ افزایش می‌یابد. آزمایشات دیگری نیز افزایش فراکسیون آزاد اسید والپروئیک راحتی تا دو برابر مقدار معمول بعد از مصرف یکدوز بالا نشان داده است زیرا دفع این دارو بمقدار کم و محدود از طریق کبد انجام میشود، بنابراین افزایش فراکسیون آزاد برحسب مقدار مصرف دارو را میتوان مربوط به وابستگی غلظتی (Concentration-dependen) در اتصال به آلبومین دانست (۱۲)، درمیزان درمانی هنگامیکه مقدار سالیسیلات پلاسما بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در لیتر برسد، فراکسیون آزاد به حدود ۵۰٪ افزایش می‌یابد. این افزایش مقدار در مقادیر توکسیک مخاطره آمیز است (۳)، دیزوپیرامید نیز بعنوان یک داروی Dose-dependent مورد مطالعه قرار گرفته است (۶۰).

تداخل و جایجایی داروها:

تداخل داروها ممکن است در اثر رقابت مستقیم دو دارو جهت جایگزینی در روی یک جایگاه اتصالی باشد که در نتیجه اتصال یکی سبب تضعیف جایگزینی دیگری میگردد و یا اینکه اثر یک دارو بر روی متابولیسم و میزان دفع داروی دیگر باشد. بطور مثال میتوان تداخل اثر فنی توئین را با اسید والپروئیک (۱۵) و وارفارین را با فنیل بوتازون با سایر داروهای غیر استروئید ضد التهاب نام برد (۳۸). اسید والپروئیک سبب آزاد شدن فنی توئین از جایگاه اتصالش در آلبومین میشود و در نتیجه بر میزان فراکسیون آزاد این دارو در پلاسما تا حد ۱۰۰٪ افزایش می‌یابد، و چون دفع کبدی این دارو وابسته به فراکسیون آزاد آن میباشد بنابراین میزان دفع آن افزوده میگردد، در نتیجه میزان نام دارو کاهش می‌یابد در صورتیکه مقدار فراکسیون آزاد تغییری نکرده است (۵۹). سایر داروهای ضد تشنج (Anti convulsant) مانند فنی توئین کاربامازپین، و فنوباریتال اثری روی اتصال اسید والپروئیک به آلبومین ندارند زیرا اتصال اسید والپروئیک به آلبومین محکمتر از سایر داروها به آلبومین بوده بطوریکه ضریب اتصال آنها برای اسید والپروئیک و فنی توئین و کاربامازپین بترتیب $1/3 \times 10^4$ ، $1/4 \times 10^3$ ، و مولارکنسانتراسیون اسید والپروئیک نیز از سایر داروهای نامبرده بیشتر است. جایجایی اسید والپروئیک بوسیله سالیسیلات در محیط خارج و در بدن موجود زنده نیز مورد مطالعه قرار گرفته

در حدود ۲۶% در فراکسیون آزاد دیازپام (۱۷) میشود ولی در حضور یک مهارکننده لیهوپروتئین لیپاز، تجویز، حتی مقادیر بالای هپارین اثری روی اتصال Prazosin و فنی توئین نمیگذارد (۵۶).

علائم بالینی تغییرات میزان اتصال دارو به پروتئین: اصولاً "تعیین میزان درمانی یک دارو باید براساس اندازه‌گیری مقدار فراکسیون آزاد آن باشد، زیرا مولکولهای آزاد قادرند جایگاههای رسپتور مربوطه را اشغال نموده و خواص دارویی را نشان دهند. متأسفانه بعلت مشکل بودن روشهای آزمایشگاهی اندازه‌گیری فراکسیون آزاد دارو، معمولاً "اثرات کلینیکی دارو براساس مقدار تام آن در پلاسما بررسی میشود از آنجائیکه میزان داروی متصل به پروتئین مقدار معلومی می‌باشد بنابراین بنظر میرسد اندازه‌گیری مقدار تام دارو، مقدار آزاد آنرا نیز شامل شده و اندازه‌گیری فراکسیون آزاد دارو و بطور روتین غیر ضروری می‌نماید ولسی باید دانست میزان فراکسیون متصل به پروتئین دارو در بعضی حالات پاتولوژیک متغیر و غیر طبیعی میباشد، بنابراین بررسی اثرات فارماکولوژیک با داروی آزاد بهتر مشخص میشود و تعیین میزان درمانی براساس مقدار تام دارو ممکن است دارای ارزش چندانی نباشد.

میزان اتصال دارو به پروتئین برحسب غلظت غیر طبیعی پروتئین‌ها، تداخل داروها و جایجایی آنها و وابستگی غلظتی اتصال دارو متغیر است ولی تمام حالات غیر طبیعی ذکر شده بر روی مقدار داروی آزاد که مشخص‌کننده علائم کلینیکی آن میباشد اثر نمیگذارد (مقدار داروی آزاد (Free drug concentration) آن مقدار از فراکسیون آزاد دارو میباشد که عملاً "فعال است). از طرفی براساس اصول فارماکوکینیتیک تغییرات فراکسیون متصل به پروتئین داروها در شرایطی که همواره بمقدار ثابتی دارو وارد بدن میشود و بمقدار معینی هم دفع میگردد بر مقدار آزاد دارو موثر واقع نمیشود. فقط قادر به تغییر میزان تام دارو میباشد و بعلاوه در شرایطی هم که مقدار داروی آزاد تغییر کند آثار کلینیکی آن نیز با توجه به وسعت اثرات درمانی آن بررسی میشود، کمترین تغییر مقدار آزاد فنی توئین روی اثرات درمانی آن منعکس میشود زیرا خواص درمانی این دارو محدود میباشد در صورتیکه در پروپرانولول بعلت وسعت خواص درمانی حداقل

تغییر در مقدار آزاد دارو که منتج به نشان دادن آثار کلینیکی میشود معلوم نیست ولی تحمل بیماران برای حد ماکزیمم مقدار دارو بخوبی شناخته شده است (۲۵) معیناً اهمیت تغییرات فراکسیون متصل به پروتئین در تفسیر مقدار داروی سرم و یا پلاسما باید مورد توجه باشد زیرا تعیین میزان درمانی دارو براساس تعیین غلظت تام آن در تمام حالاتی که مقدار تام دارو دچار تغییراتی شده ولی میزان داروی آزاد تغییری نکرده باشد ممکن است جهت درمان ناکافی و یا در جهت عکس بعلت زیاد بودن سبب مسمومیت گردد.

کاربرد کلینیکی اندازه‌گیری میزان داروی آزاد:

در تمام حالاتیکه تغییرات میزان فراکسیون متصل به پروتئین دارو بر روی مقدار آزاد دارو اثر میگذارد که در نتیجه منجر به تغییراتی در نشانه‌های بالینی میگردد، تعیین مقدار تام دارو جهت معلوم نمودن، میزان درمانی، سبب گمراهی است، تعیین مقدار آزاد دارو راهنمای بهتری است. در نشانه‌های بالینی میگردد،

در هیپوآلبومینمیا (Hypoalbuminemia) حاصل از بیماریهای کبدی، کاهش مقدار دارو در اتصال به آلبومین در مقایسه با شدت ظهور علائم بالینی خیلی بطئی و تدریجی است، در شرایطی که مقدار دفع داروی آزاد تغییری نکرده باشد یک مکانیسم جبران‌کننده جهت حفظ مقدار داروی آزاد سبب افزایش دفع داروی تام میشود.

در اختلالات کبدی که سبب مقادیر بالای فراکسیون متصل به پروتئین شوند دفع مقدار داروی آزاد کاهش می‌یابد و در نتیجه مقدار داروی آزاد، برای مدت طولانی نمیتواند دارای وضع ثابتی باشد مانند فنی توئین و اسیدوالپروئیک. بیماریهای کبدی پیشرفته ممکن است با کاهش غلظت

تام دارو، افزایش فراکسیون آزاد و مقدار داروی آزاد همراه باشد در چنین شرایطی بهتر است مقادیر آزاد فنی توئین و اسیدوالپروئیک اندازه‌گیری شده و در موارد پیشرفته‌تر چون تعیین ارتباط بین وسعت بیماری و میزان دفع داروی آزاد مشکل میشود بنابراین بیماران مربوطه باید با اندازه‌گیری مقدار داروی آزاد تحت نظر گرفته شوند.

در بیماریهای کلیوی کاهش اتصال پروتئینی وجود دارد، مقدار تام دارو نیز کاهش می‌یابد در صورتیکه فراکسیون آزاد دارو افزایش می‌یابد حال آنکه غلظت داروی

بررسی های انجام شده در مورد داروهای کاتیونیک موید آنست که در بعضی حالات حاد کلینیکی، اندازه گیری میزان داروی آزاد بمراتب بهتر از داروی تام نشانگر اثرات دارو، میباشد بخصوص در مورد داروهای کاتیونی که به AAG و لپیپروتئین ها متصل میشوند. زیرا بعد از آسیب های شدید نسوج مانند آنفارکتوس میوکاردی و جراحی ها میزان درپلازما دچار تغییرات سریعی میشود و لپیپروتئین ها نیز در اثر تغذیه دستخوش تغییراتی میگردند، بنابراین برای کنترل درمان این قبیل موارد بحرانی و بی ثبات، بررسی میزان تام دارو شاخص مطمئن نبوده و تعیین میزان داروی آزاد بخصوص در مورد داروهای قلبی بتا - بلوکر (Beta-blocker) و بلوکرهای کلسیم در مرحله Post-infarction اثرات درمانی را بهتر نشان میدهند (البته مطالعات در این زمینه ها ادامه دارد). دوره بارداری، زایمان، و بلافاصله بعد از وضع حمل با تغییرات زیادی در پروتئین واسیدهای چرب پلازما همراهند، داروهایی که در این ایام مصرف میشوند با درصد بالایی به پروتئین متصل میشوند مانند میریدین و بوهپی و اکائین و دیازپام سبب تغییرات ونوسان در فراکسیون آزاد و بالاخره مقدار داروی آزاد میگردند، نکته قابل توجه برای متخصصین زنان و بیهوشی این است که داروهایی استفاده نمایند که تعیین مقدار، آزاد آن کمکی برای مراقبت های دوره بارداری باشد.

نتیجه:

مطالعات انجام شده موید آنست که جهت بررسی خواص دارو و ادامه درمان، اندازه گیری میزان داروی آزاد نسبت به مقدار تام آن ارجح است بخاطر ارتباط بهتر آن به اثرات فارماکولوژیکی دارو و اطلاعات کلینیکی حاصل از آن در بیماران. معیاد اندازه گیری مقدار تام دارو بعنوان یک کار روتین معمول است. اگرچه بررسی خواص درمانی و ادامه آن از روی مقدار تام در بعضی موارد تکافو میکند ولی بعلت اطلاعات ناقص از میزان اتصال به پروتئین و اثرات تغییرات آن بر روی متابولیسم دارو و دفع آن و بخصوص در شرایطی که تغییرات میزان قابل اتصال به پروتئین منتج به یک مقدار غیر قابل استفاده از داروی آزاد میشود همه اینها عواملی هستند که به اندازه گیری مقدار آزاد دارو

آزاد تغییری را نشان نمیدهد، در نتیجه مقدار تام درمانی در حدی پایین تر از معمول قرار دارد. مطالعاتی چند در مورد اتصال پروتئینی فنی توئین واسیدوالپروئیک در بیماران کلیوی مبتلا نشانگر تناسبی است بین میزان فراکسیون آزاد دارو با شدت نارسایی کلیه ها، بنابراین میتوان از روی مقادیر مختلف کراتی نین سرم مقدار تام دارویی که بتواند حد لازم درمانی داروی آزاد را تامین کند محاسبه کرد، (۱۱ و ۲۴).

جابجایی دارو با ترکیبات دیگر سبب یک کاهش شدید در مقدار فراکسیون متصل به پروتئین و جدا شدن ناگهانی مقداری دارو از پروتئین و افزایش بسیار داروی آزاد میشود و اگر عوامل جابجایی از طریق تزریق وارد خون شوند سرعت عمل بیشتر است.

افزایش شدید داروی آزاد در شرایطی که میزان انتشار دارو کم و ضریب درمانی (Therapeutic index) آن نیز پایین باشد و بطور محدود نیز دفع گردد چه بسا که سبب رسوب دارو و یا خنثی شدن اثر آن گردد. بعنوان نمونه این قبیل تداخلها میتوان، جابجایی وارفارین بوسیله داروهای ضد التهابی - غیر استروئیدی فنیل بوتازون و فنی توئین با اسیدوالپروئیک را نمونه تداخل اثرات دارویی که منتج به مسمومیت دارویی میشوند، دانست، در این قبیل موارد بررسی میزان داروی آزاد نسبت به مقدار تام ارتباط بهتری را با علائم بالینی نشان میدهد.

وابستگی غلظتی دارو را در تعیین مقدار درمانی اسیدوالپروئیک و دیزوپرامید باید در نظر داشت زیرا محاسبه غلظت تام دارو معیاری جهت تعیین غیر مستقیم غلظت داروی آزاد نیست و این پدیده حداقل مسئول بخشی از داروی تام پلازما است که بصورت غیر خطی میباشد در صورتیکه مقدار داروی آزاد در شرایط ثابت نسبت به میزان درمانی دارای منحنی خطی است. بهمین دلیل افزودن میزان مصرفی دارو بسبب افزایش کمتری از حد انتظار در مقدار تام میشود. حال آنکه بر مقدار داروی آزاد افزوده میگردد، نکته دیگر اینکه متابولیت های دیزوپیرامید بنام (dealkyl-metabolite) که میتوانند به پروتئین اتصال یابند و با داروی مربوطه نیز در اتصال به پروتئین رقابت میکنند. بنابراین با توجه به نکات ذکر شده در مورد این دارو، ملاحظه میشود اندازه گیری میزان داروی آزاد در کمک به پیگیری درمان موثرتر میباشد.

بیشتر توجه شود و اگرچه روشهایی مانند تعادل دیالیز و اولترافیلتراسیون و یا اولتراسانتریفوگاسیون هر کدام به دلایلی مانند طول زمان آزمایش و یا علل دیگر کمتر کاربرد داشته اند و روش رادیوایمونوایسی نیز جز در آزمایشگاههای مجهز و شرایط خاص بکار نرفته است، معینا نیاز کلینیکی انگیزه‌ای خواهد شد تا تکنولوژیست ها در پی ابداع روشهای جدید و قابل انجامی جهت بررسی مقدار داروی آزاد بعنوان یک کار روتین در آزمایشگاههای بالینی باشند.

جدول I اسامی داروهائی را که بیشتر در شیمی کلینیک کاربرد دارند و میزان درصد اتصال آنها را به پروتئین نشان میدهد:

داروها	% اتصال	پروتئین ها	منابع
استامینوفن	۰		۲۴
استیل پروکائین آمید N-Acetylprocainamide	۱۰ ± ۹		"
آمیکاسین Amikacin	۴ ± ۵/۸		"
امیتریپتیلین Amitriptyline	۹۴/۸	ALB , AAG , LP	"
کاربامازپین Carbamazepine	۷۴	ALB, AAG	"
کلرآمفتیکل Chloramphenicol	۵۳	ALB	"
کلردیازپوکساید Chlordiazepoxide	۹۶/۵	ALB	"
کلرپرومازین Chlorpromazine	۹۵-۹۸	ALB, AAG, LP	"
دزی پرامین Desipramine	۹۰	ALB, AAG, LP	"
دیازپام Diazepam	۹۵-۹۹	ALB	"
دیجی‌توکسین Digitoxin	۹۵-۹۷	ALB	"
دیگوکسین Digoxin	۲۵	ALB	"
دیپروپرامید Disopyramide	۶۶-۸۱ a	ALB, AAG	۲۵-۵
اتوسوکس ایمید Ethosuximide	۰		۲۴
جنتامایسین Gentamicin	<۱۰		"
ایمپیرامین Imipramine	۸۹-۹۴	ALB, AAG, LP	"
لیدوکائین Lidocaine	۷۰ ± ۵	ALB, AAG	"
لیتیوم Lithium	۰	---	"
متوترکسیت Methotrexate	۵۸ ± ۷	ALB	"
نورتتریپتیلین Nortriptyline	۹۲ ± ۲	ALB, AAG	"
فنوباربیتال Phenobarbital	۵۱ ± ۳	ALB	"
فنی‌توئین Phenytoin	۸۹ ± ۳	ALB	"
پریمیدون Primidone	۱۹-۲۵	ALB	"
پروکائین آمید Procainamide	۱۶ ± ۵	?	"
پروپرانولول Propranolol	۸۸-۹۵	ALB, AAG, LP	"
کینیدین Quinidine	۷۱	ALB, AAG, LP	۲۹
سالیسیلیک اسید Salicylic acid	۸۰-۹۵	ALB	۶
تئوفیلین Theophylline	۳۴-۴۵ c	ALB	۵۷-۷
تولبوتامید Tolbutamide	۹۳-۹۶	ALB	۲۴
والپروئیک اسید Valproic acid	۹۳ d	ALB	"
وارفارین Warfarin	۹۹	ALB	"

* D.D=Dose-dependent

۸۱% در ۱/۷ µg/ml و ۶۶% در ۵ µg/ml
 ۹۵% در ۱۴ µg/ml و ۸۰% در ۳۰۰ µg/ml
 ۳۴-۳۸% باروش دیالیزو ۴۵-۴۱% با اولترافیلتراسیون
 ۹۵% در ۳۰ µg/ml و ۷۵% در ۱۶۰ µg/ml

References:

- 1- Affirm M, Reidenberg MM. Protein binding of some drugs in plasma from patients with alcoholic liver disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1975, 8: 267-269.
- 2- Albani F, Riva R, Contin M, Baruzzi A, Altomare M, Merlin G, Perucca. Differential transplacental binding of valproic acid: influence of free fatty acids. *Br J Clin Pharmacol* 1984; 17: 759-762.
- 3- Alvan G, Bergman U, Gustafsson H. High unbound fraction of salicylate in plasma during intoxication. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11: 625-626.
- 4- Bickel MH. Binding of chlorpromazine and imipramine to red cell, albumin, lipoproteins and other blood components. *J Pharm Pharmacol* 1975; 27: 733-738.
- 5- Bredeneň JE, Pike E, Lunde PKM. Plasma binding of disopyramide and mono-n-dealkyl disopyramide. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 14: 673-676.
- 6- Borga O, Odar-Cederlof I, Ringberger V, Norlin A. Protein binding of salicylate in uremic and normal plasma. *Clin Pharmacol. Ther.* 1976; 20: 464-475.
- 7- Brors O, Sagar G, Sandnes D, Jacobson S. Binding of theophylline in human serum determined by ultrafiltration and equilibrium dialysis. *Br J Clin Pharm.* 1983; 15: 393-397.
- 8- Bowers WF, Fulton S, Thompson J. Ultrafiltration vs. equilibrium dialysis for determination of free fraction. *Clin Pharmacokinet.* 1984; 9 (suppl.1): 49-60.
- 9- Brors O, Nilsen OG, Sager G, Sandnes D, Jacobsen S. Influence of pH and buffer type on drug binding in human serum. *Clin Pharmacokinet* 1984; 9 (Suppl.1): 85-86.
- 10- Blaschke TF, Meffin PJ, Melmon KL, Rowland M. Influence of acute viral hepatitis on phenytoin kinetics and protein binding. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 17: 685-691.
- 11- Belpaire FM, Bogaert MG, Mussche MM. Influence of renal failure on the protein binding of drugs in animals and man. *Eur J Clin Pharmacol* 1977; 11: 27-32.
- 12- Bowdle TA, Patel I, Levy RH, Wilensky AJ. Valproic acid dosage and plasma protein binding and clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28: 486-492.
- 13- Divoll M, Gck B, Patterson RJ, Levy G. Serum protein binding of drugs during and after pregnancy in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28: 253-261.
- 14- Divoll M, Greenblatt DJ. Effect of age and sex on lorazepam protein binding. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 122-123.
- 15- Dahlqvist R, Borga O, Rane A, Walsh Z, Sjoqvist F. Decreased plasma protein binding of phenytoin in patient on valproic acid. *Br J Clin Pharmacol* 1979; 8: 547-552.

- 16- D'Arcy PF, McElnay JC. Drug interaction involving the displacement of drugs from plasma protein and tissue binding sites. *Pharmacol Ther* 1982; 17: 211-
- 17- Desmond PV, Roberts RK, Wood AJJ, Dunn GD, Wilkinson GR, Shenker S. Effects of heparin administration on plasma binding of benzodiazepines, *Br J Clin Pharmacol* 1980; 9: 171-175.
- 18- Feely J, Forrest A, Gunn A, Hamilton W, Stevenson I, Crooke J. Influence of surgery on plasma propranolol levels and protein binding. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28: 759-764.
- 19- Freilich DI, Giardina EV. Imipramine binding to alpha₁-acid glycoprotein in normal subjects and cardiac patients. *Clin Pharmacol Ther* 1984, 35: 670-674.
- 20- Furst D, Tozer TN, Melmon KL. Salicylate clearance, the result of protein binding and metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 26: 380.
- 21- Friedman LA, Lewis PJ, The effect of semisynthetic penicillins on the binding of bilirubin by neonatal serum. *Br J Clin Pharmacol* 1980; 9: 61-65.
- 22- Gugler R, Mueller G. Plasma protein binding of valproic acid in healthy subjects and in patients with renal disease. *Br J. Clin Pharmacol* 1978; 44: 446.
- 23- Goolkasian DL, Slaughter RL, Edwards DJ, Lalka D. Displacement of lidocaine from serum α_1 - acid glycoprotein sites by basic drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 1983; 25: 413-417.
- 24- Goodman Gilman A, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 1985; 7th ed: 1668-1713. Macmillan publishing company. New York. Toronto, London.
- 25- Greenblatt DJ, Sellers EM, Koch-weser J. Importance of protein binding for the interpretation of serum or plasma drug concentrations, *J Clin Pharmacol* 1982; 22: 259-263.
- 26- Hamar C, Levy G. Serum binding of drugs and bilirubin in newborn infants and their mothers. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28: 58-63.
- 27- Jochemsen R, Van der Graaff M, Boeijinga JK, Breimer DD. Influence of sex, menstrual cycle and oral contraceptives on the disposition of nitrazepam. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 13: 319-324.
- 28- Jusko W, Gretch M. Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics. *Drug Metab Rev* 1976; 5: 43-140.
- 29- Kates RE, Sokoloski TD, Comstock TJ. Binding of quinidine to plasma proteins in normal subjects and in patients with hyperlipoproteinemias. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23: 30-35.
- 30- Koch-Weser J, Sellers EM. Binding of drugs to serum albumin-Part I. *New Engl*

- J Med 1976; 294-311-316.
- 31- Kristensen CB. Imipramine serum protein binding in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther 1983; 34: 689-694.
- 32- Kraus JW, Desmond PV, Marshall JP, Johnson RF, Schenker S, Wilkinson GR. Effects of aging and liver disease on disposition of lorazepam. Clin Pharmacol Ther 1978; 24: 411-419.
- 33- Keefe DL, Yee YG, Kates RE. Verapamil protein binding in patients and in normal subjects. Clin Pharmacol Ther 1981; 29: 21-26.
- 34- Kwong TC, Sparks JD, Sparks CE. Lipoprotein and protein binding of the calcium channel blocker diltiazem. Proc Soc Exp Biol Med 1985; 178: 313-316.
- 35- Lima JJ, Boudoulas H, Blanford M. Concentration-dependence of disopyramide binding to plasma protein and its influence on kinetics and dynamics. J. Pharmacol Exper Therapeut 1981; 219: 741-747.
- 36- Lowenthal DT. Pharmacokinetics of propranolol, quinidine, procainamide and lidocaine in chronic renal disease. Am J Med 1977; 62: 532-538.
- 37- Mackichan JJ. Pharmacokinetic consequences of drug displacement from blood and tissue proteins. Clin Pharmacokinet 1984; 9 (suppl I): 32-41.
- 38- McElnay JC, D'Arcy PF. Displacement of albumin-bound warfarin by anti-inflammatory agents in vitro. J Pharm Pharmacol 1980; 32: 709-711.
- 39- Nau H, Luck W, Kuhn W. Decreased serum protein binding of diazepam and its major metabolite in the neonate during the first postnatal week related to increased free fatty acid levels. Br J Clin Pharmacol 1986; 17: 92-98.
- 40- Nau H, Rating D, Koch S, Hauser I, Helge H. Valproic acid and its metabolites: placental transfer, neonatal pharmacokinetics, transfer via mother's milk and clinical status in neonates of epileptic mothers. J Pharmacol Exp Ther 1981; 219: 768-777.
- 41- Nation RL. Meperidine binding in maternal and fetal plasma. Clin Pharmacol Ther 1981; 29: 472-479.
- 42- Nilson OG, Storstein L, Jacobsen S. Effect of heparin and fatty acids on the binding of quinidine and warfarin in plasma. Biochem Pharmacol 1977; 26: 229-235.
- 43- Orr JM, Abbott FS, Farrell K, Ferguson S, Sheppard I, Godolphin W. Interaction between valproic acid and aspirin in epileptic children serum protein binding and metabolite effects. Clin Pharmacol Ther 1982; 31: 642-649.
- 44- Perucca E, Crema A. Plasma protein binding of drugs in pregnancy. Clin Pharmacokinet 1982; 7: 336-352.
- 45- Peterson MC, Moore RG, Nation RL, McMeiman W. Relationship between the trans-

- placental gradients of bupivacaine and α -acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12: 859-862.
- 46- Perucca E, Ruprah M, Richens A. Decreased serum protein binding of diazepam and valproic acid in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12: 276.
- 47- Perez-Mateo M, Erill S. Protein binding of salicylate and quinidine in plasma from patients with renal failure, chronic liver disease and chronic respiratory insufficiency. *Eur J Clin Pharmacol* 1977; 11: 225-231.
- 48- Piafsky KM. Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1980; 246-262.
- 49- Pond SM, Tozer TN. First pass elimination, basic concepts and clinical consequences. *Clin Pharmacokinet* 1986; 9: 1-25.
- 50- Ridd MJ, Brown KF, Nation RL, Collier CB. Differential transplacental binding of diazepam: causes and implications. *Eur J Clin Pharmacol* 1983; 24: 595-601.
- 51- Routledge PA, Stargel WW, Wagner GS, Shand DG. Increased plasma propranolol binding in myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol* 1980; 9: 438-439.
- 52- Rowland M, Tozer TN. In: *clinical pharmacokinetics: Concepts and Applications*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1980.
- 53- Roberts RK, Desmond PV, Wilkinson GR, Schenker S. Disposition of chlorthalidone: sex differences and effects of oral contraceptives. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 25: 826-831.
- 54- Routledge PA, Stargel WW, Kitchell BB, Barchowski A, Shand DG. Sex-related differences in plasma protein binding of lidocaine and diazepam. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11: 245-250.
- 55- Sager G, Nilsen O, Jacobsen S. Variable binding of propranolol in human serum. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 905-911.
- 56- Schultz F, Giacomini KM, Luttrell S, Turner-Tamiyasu K, Blaschke TF. Effect of low doses of heparin on the plasma binding of phenytoin and prazosin in normal man. *Eur J Clin Pharmacol* 1983; 25: 211-214.
- 57- Shaw L, Fields L, Maycock R. Factors influencing theophylline serum protein binding. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 32: 490-496.
- 58- Tamir I, Rifkind BM, Levy RI. Measurements of lipids and evaluation of lipid disorder. In: Henry, ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Vol. I, 16th Ed Philadelphia: WB Saunders, 1979: 189-227.
- 59- Tsanaclis LM, Allen J, Perucca E, Richens A. Effects of valproate on free plasma phenytoin concentrations. *Br J Clin Pharmacol* 1984; 18: 17-20.
- 60- Whiting B, Holford NHG, Sheiner LB. Quantitative analysis of the diazepam concentration effect relationship. *Br J Clin Pharmacol* 1980; 9: 67-75.

-
- 61- Wilkinson GR, Shand DG. Aphysiological approach to hepatic drug clearance. Clin Pharmacol Ther 1975; 18: 377-390.
- 62- Woo E, Greenblatt DJ. Pharmacokinetic and clinical implications of quinidine protein binding. J Pharm Sci 1979; 4: 466-469.
- 63- Wood M, Wood AJJ. Changes in plasma binding and α_1 -acid glycoprotein in mother and newborn infant. Clin Pharmacol Ther 1981, 29: 522-526.
- 64- Wood AJ, Kornhauser DM, Wilkinson GR, Shand DG, Branch RA. The influence of cirrhosis on steady-state blood concentrations of unbound propranolol after oral administration. Clin Pharmacokinet 1978; 3: 478-487.