

mgr farm. Arkadiusz Kocur

**Terapeutyczne monitorowanie stężeniem takrolimusu
i kwasu mykofenolowego z zastosowaniem mikropróbkiowania
objętościowo-absorpcyjnego połączonego z techniką LC-MS/MS
u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki**

THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF TACROLIMUS AND MYCOPHENOLIC ACID USING
VOLUMETRIC ABSORPTIVE MICROSAMPLING COUPLED WITH LC-MS/MS TECHNIQUE
IN PEDIATRIC RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne przygotowana w oparciu o cykl publikacji**

Promotor: dr hab. n. farm. Tomasz Pawiński

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Dorota Marszałek

Zakład Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny



**Obrona rozprawy doktorskiej
przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Warszawa, rok 2023

Słowa kluczowe:

mikropróbki, przeszczepienie nerki, takrolimus, kwas mykofenolowy, LC-MS/MS, walidacja kliniczna, terapeutyczne monitorowanie leków

Keywords:

microsampling, renal transplantation, tacrolimus, mycophenolic acid, LC-MS/MS, clinical validation, therapeutic drug monitoring

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2021 – 2023, przy udziale pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych w Poradni Transplantacji Nerek Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.



Część badań została zrealizowana w ramach kierowanego przeze mnie grantu „Młody Badacz” przyznanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny- nr F/MB/01/22 (lata realizacji 2022 - 2023)



Część badań wchodzących w skład niniejszej pracy była realizowana z wykorzystaniem infrastruktury badawczej Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego oraz Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

*"Nothing is more rewarding than knowing
you have given a child a second chance"*

*„Nic nie jest bardziej satysfakcjonujące niż świadomość,
że dałeś dziecku drugą szansę”*

Stephen P. Dunn, MD

SPIS TREŚCI

1. Podziękowania	11
2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	13
3. Biografia i całkowity dorobek naukowy	15
4. Wykaz skrótów	19
5. Streszczenie	22
6. <i>Abstract</i>	25
7. Wprowadzenie	28
8. Cel pracy	39
9. Materiały i metody	43
10. Uzyskane wyniki i dyskusja	49
11. Wnioski	56
12. Perspektywy na przyszłość	59
13. Bibliografia	61
14. Kopie opublikowanych prac włączonych do cyklu doktorskiego	65
15. Kopie zgód Komisji Bioetycznej	149
16. Oświadczenia autora cyklu doktorskiego	157
17. Oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład cyklu doktorskiego	163

PODZIĘKOWANIA

Składam ogromne podziękowania Panu **dr hab. Tomaszowi Pawińskiemu** za wspaniałą opiekę promotorską, przekazaną cenną wiedzę dotyczącą terapii monitorowanej, dbanie o mój rozwój naukowy, okazane zaufanie i ogromną życzliwość

Pani **dr Dorocie Marszałek** dziękuję za nieocenioną opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę i zamiłowanie do prowadzenia prac naukowych, ogromną życzliwość, jak również nieustanne wsparcie w dążeniu do wymarzonego celu

Założone cele badawcze nie zostałyby osiągnięte bez cennego wsparcia klinicznego w osobie **dr. Jacka Rubika**, dzięki któremu udało się w szybkim czasie uzyskać zadowalającą ilość materiału do badań, jak również sprawdzić użyteczność kliniczną opracowanych metod, za co serdecznie dziękuję

Mgr Agnieszce Czajkowskiej, kierującej Pracownią Farmakokinetyki, Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie dziękuję za wsparcie w kolekcjonowaniu materiału do badań, przyjacielską postawę, zaufanie oraz wielokierunkową współpracę naukową

Dziękuję moim **współpracownikom z Zakładu Chemii Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** za codzienną pomoc w realizacji zadań naukowych oraz dydaktycznych, przekazaną wiedzę, a także za atmosferę życzliwości w pracy

Moim **współpracownikom z Pracowni Farmakokinetyki, Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie** dziękuję za codzienną życzliwość, wsparcie i przekazane doświadczenie dotyczące terapii monitorowanej i analiz farmakokinetycznych

Dziękuję również **mgr. Maciejowi Sierakowskiemu** z Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, za możliwość przeprowadzenia części badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy oraz okazaną życzliwość

Pawłowi Czarnowskiemu i Ernestowi Malczewskiemu dziękuję za wieloletnią, prawdziwą przyjaźń, nieocenione wsparcie w momentach zwątpienia oraz w realizacji wymarzonych celów

Dziękuję również **rodzinie i bliskim**, a w szczególności **siostrze Agnieszce** za okazane wsparcie w trudnych chwilach i nieustanne kibicowanie, jak również nieocenioną pomoc na wielu płaszczyznach

*Pracę dedykuję mojej ukochanej Kasi,
której dziękuję za wyręczanie w wielu codziennych obowiązkach,
okazane wsparcie w dążeniu do celu i trudnych momentach,
ogromną cierpliwość i wyrozumiałość*

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

W skład przedstawionej pracy doktorskiej zostały włączone trzy, tematycznie powiązane ze sobą artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie międzynarodowym z listy filadelfijskiej – publikacja przeglądowa (**P₁**) stanowiąca wstęp teoretyczny do dwóch prac doświadczalnych (**P₂** i **P₃**).

Poniżej przedstawiono wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu pracy doktorskiej, o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor (IF) równym **15,40** i łącznej punktacji MEiN równej **420** (na podstawie komunikatu MEiN z dn. 17 lipca 2023r.). Dane bibliometryczne sporządzono w oparciu o wskaźniki publikacyjne obowiązujące w roku publikacji pracy.

(1) Publikacja przeglądowa – oznaczona jako **P₁** (IF₂₀₂₃=5,60; 140 pkt. MEiN₂₀₂₃)

Kocur A, Pawiński T*. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):681. <https://doi.org/10.3390/ijms24010681>

(2) Publikacja oryginalna – oznaczona jako **P₂** (IF₂₀₂₃=5,40; 140 pkt. MEiN₂₀₂₃)

Kocur A*, Marszałek D, Rubik J, Czajkowska A, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*. 2023; 15(1):299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>

(3) Publikacja oryginalna – oznaczona jako **P₃** (IF₂₀₂₃=4,40; 140 pkt. MEiN₂₀₂₃)

Kocur A*, Rubik J, Czarnowski P, Czajkowska A, Marszałek D, Sierakowski M, Górka M, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly With Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, And Clinical Application. *Pharmacological Reports*. 2023; *Publication accepted – ahead of print* <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00509-w>.

* - autor korespondencyjny

CAŁKOWITY DOROBEK NAUKOWY

- **Dorobek publikacyjny**
(całkowita punktacja dorobku publikacyjnego: **IF₂₀₂₃=17,90; 437 pkt. MEiN**)

Wymieniono pozostałe publikacje niewłączone do cyklu pracy doktorskiej:

1. Pawłowska A, **Kocur A**, Paradowska K, Siudem P*. Badanie stabilności oleju lnianego i oleju z czarnuszki. *Postępy Fitoterapii*. 2018; 19.3: 157-163.
2. Kunicki PK, Pawiński T, **Kocur A**. The generic formulations of immunosuppressive drugs and the role of TDM – The questions still remain! "On behalf of IATDM&CT Immunosuppressive Drugs Committee", *IATDM&CT Compass*, 2019 – praca popularnonaukowa
3. **Kocur A***, Marszałek D, Pawiński T. Zastosowanie Metod Analitycznych w Oznaczaniu Aktywności Dehydrogenazy Inozynomonofosforanowej (IMPDH) Podczas Terapii Immunosupresyjnej. *Prospects in Pharmaceutical Sciences*. 2020; 18.5: 40-49.
4. **Kocur A**, Kunicki PK, Pawiński T*. Generic medicinal products in immunosuppressive therapy—should it be a challenge for therapeutic drug monitoring? *Therapeutic Drug Monitoring*. 2022; 45(2): 173-190.

- **Doniesienia zjazdowe**

- ✓ **Kocur A**, Marszałek D. Opracowanie i walidacja metody chromatograficznej (HPLC-UV/VIS) oznaczania ksantyny. *IX Minisymposium Młodych Naukowców na Wydziale Farmaceutycznym WUM* (Warszawa, 19 lutego 2019; sesja posterowa)
- ✓ **Kocur A**, Marszałek D, Pawiński T. Development method of IMPDH activity quantification in immunosuppressive therapy. *15th Warsaw International Medical Congress* (Warszawa, 9-12 maja 2019; wystąpienie ustne)
- ✓ **Kocur A**, Marszałek D, Pawiński T. Validation of a new LC-MS/MS method of tacrolimus concentration measurement in the blood samples collected by volumetric-absorptive microsampling. *Międzynarodowa Konferencja Accord* (Warszawa, 26-28 maja 2022; sesja posterowa)

- ✓ **Kocur A**, Marszałek D, Pawiński T, Rubik J, Czajkowska A. Volumetric-absorptive microsampling as a novel approach to tacrolimus concentration measurement in pediatric population during immunosuppressive therapy. *Międzynarodowy Kongres IATDM&CT* (Praga, 18-21 września 2022; sesja posterowa)
- ✓ **Kocur A**, Rubik J, Czajkowska A, Pawinski T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid and tacrolimus based on volumetric-absorptive microsampling (VAMS) as a reliable tool for adherence monitoring in renal pediatric transplant recipients - single-center, open-label, randomized controlled trial. *Międzynarodowy Kongres IATDM&CT* (Oslo, 24-27 września 2023; sesja posterowa)
- ✓ **Kocur A**, **Pawiński T**, Rubik J, Czajkowska A. Clinical validation of volumetric-absorptive microsampling device for mycophenolic acid determination in pediatric patients after renal transplantation. *Międzynarodowy Kongres IATDM&CT* (Oslo, 24-27 września 2023; wystąpienie ustne)
- ✓ **Czajkowska A**, Górka M, **Kocur A**. Simultaneous HPLC-DAD determination of flecainide, amiodarone, and desehtyloamiodarone based on internal standards in pediatric patients with arrhythmia. *Międzynarodowy Kongres IATDM&CT* (Oslo, 24-27 września 2023; sesja posterowa)
- ✓ **Kocur A**. TDM of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS). *Międzynarodowy Kongres IATDM&CT* (Oslo, 24-27 września 2023; wykład plenarny)

- **Realizacja grantów i projektów**

- ✓ **Kierownik projektu „Młody badacz” przyznanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny w roku 2022, na temat: *Mikropróbkowanie objętościowo-absorpcyjne (VAMS) podczas monitorowania stężenia takrolimusu jako nowe narzędzie do poprawy przestrzegania zaleceń lekarskich w populacji pediatrycznej - walidacja i opracowanie metody LC-MS/MS (lata realizacji 2022-2023)***

- ✓ **Wykonawca w projekcie wewnętrznym przyznanym przez Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, na temat: *Mikropróbkowanie wolumetryczno-absorpcyjne (VAMS) jako nowe narzędzie służące do optymalizacji leczenia immunosupresyjnego i monitorowania czynności przeszczepu u dzieci po przeszczepieniu nerki (lata realizacji 2023-2024)***

- **Członek afiliowany towarzystw**

- ✓ *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*

- ✓ *American Society for Mass Spectrometry*

- **Staż naukowe**

Dwumiesięczny staż naukowy (styczeń-luty 2023) w Pracowni Farmakokinetyki (Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie), opiekun stażu: mgr Agnieszka Czajkowska – zakres: analizy farmakokinetyczne na potrzeby kliniczne, terapeutyczne monitorowanie leków metodami immunochemicznymi i chromatograficznymi, podstawy toksykologii klinicznej

- **Dodatkowa działalność naukowa**

Wykonane recenzje dla czasopisma *Clinical Biochemistry* oraz *Prospects in Pharmaceutical Sciences* (łącznie 6 recenzowanych manuskryptów w roku 2023).

WYKAZ SKRÓTÓW

ASC – askomycyna
(ang. *ascomycin*)

AZA – azatiopryna
(ang. *azathioprine*)

AUC₀₋₁₂ – pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (profil 12-godzinny)
(ang. *area under the concentration-time curve, 12-hour*)

C₀ – stężenie minimalne przed przyjęciem porannej dawki leku
(ang. *trough concentration*)

CMIA – metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego
(ang. *chemiluminescent microparticle immunoassay*)

CNI – inhibitor kalcyneuryny
(ang. *calcineurin inhibitor*)

CSA – cyklosporyna A
(ang. *ciclosporin A*)

DBS – technika suchej plamki krwi
(ang. *dried blood spot*)

ESI – jonizacja typu elektrorozpylanie
(ang. *electrospray ionization*)

EMA – Europejska Agencja Leków
(ang. *European Medicines Agency*)

ESRD – schyłkowa niewydolność nerek
(ang. *end stage renal disease*)

EVE – everolimus
(ang. *everolimus*)

GKS – glikokortykosteroidy
(ang. *glucocorticosteroids*)

HE – efekt hematokrytu
(ang. *hematocrit effect*)

HPLC-DAD – wysokosprawna chromatografia cieczowa z diodową detekcją spektrofotometryczną
(ang. *high-performance liquid chromatography with diode array detection*)

HT – hematokryt
(ang. *hematocrit*)

HQC – najwyższy kalibracyjny poziom kontrolny
(ang. *higher quality control*)

IATDM&CT – Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Monitorowanej i Toksykologii Klinicznej
(ang. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*)

IPCZD – Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
(ang. *Children Memorial Health Institute*)

IMPDH – dehydrogenaza inozynomonofosforanowa
(ang. *inosine monophosphate dehydrogenase*)

ISR – powtórna analiza próbek
(ang. *incurred samples reanalysis*)

K₂-EDTA – wersenian dipotasowy
(ang. *dipotassium salt of versenic acid*)

KTx – transplantacja nerki
(ang. *renal transplantation*)

LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
(ang. *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*)

LOD – granica oznaczalności
(ang. *limit of detection*)

LQC – najniższy kalibracyjny poziom kontrolny
(ang. *lower quality control*)

ME- efekt matrycy
(ang. *matrix effect*)

MMF – mykofenolan mofetylu
(ang. *mycophenolate mofetil*)

MNA – nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych
(ang. *medical non-adherence*)

MPA – kwas mykofenolowy
(ang. *mycophenolic acid*)

MPAG – glukuronid kwasu mykofenolowego
(ang. *mycophenolic acid glucuronide*)

MQC – średni kalibracyjny poziom kontrolny
(ang. *medium quality control*)

mTOR – cel rapamycyny u ssaków
(ang. *mammalian target of rapamycin*)

NTID – lek o wąskim przedziale terapeutycznym
(ang. *narrow therapeutic index drug*)

PL – osocze
(ang. *plasma*)

3R – ograniczyć, udoskonalić, zastąpić
(ang. *reduce, refine, replace*)

SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego
(ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SIL-IS – znakowany izotopowo stabilny standard wewnętrzny
(ang. *stable isotope labelled internal standard*)

SIR – sirolimus
(ang. *sirolimus*)

TAC – takrolimus
(ang. *tacrolimus*)

TML – terapeutyczne monitorowanie leków
(ang. *therapeutic drug monitoring, TDM*)

WB – pełna krew
(ang. *whole blood*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia
(ang. *World's Health Organization*)

VAMS – mikropróbkowanie objętościowo-absorpcyjne
(ang. *volumetric absorptive microsampling*)

1. STRESZCZENIE

Transplantacja jest uważana za najlepszą metodę leczenia nerkozastępczego, szczególnie w schyłkowej fazie niewydolności nerek. Poza trudnościami wynikającymi z dostępności narządów, aspektów chirurgicznych, czy immunologicznych, w dalszym ciągu poszukuje się narzędzi pozwalających na optymalizację terapii immunosupresyjnej niezbędnej do końca życia biorcy. Szczególne trudności obserwuje się w grupie pacjentów pediatrycznych, u których brak przestrzegania zaleceń terapeutycznych (ang. *non-adherence*) dotyczących głównie przyjmowania leków, jest przyczyną ponad 70% epizodów odrzucania w pierwszym roku po transplantacji.

Podstawę leczenia immunosupresyjnego stanowi takrolimus (TAC), lek o budowie makrolidowej z grupy inhibitorów kalcyneuryny, który charakteryzuje się wąskim przedziałem terapeutycznych stężeń. Dodatkowym problemem jest duża zmienność w indywidualnej odpowiedzi na lek (zmienność wewnątrzsobnicza) oraz trudność w ustaleniu odpowiednich algorytmów populacyjnych dotyczących dopasowania dawki leku (zmienność międzysobnicza). Oznacza to, że dawka leku musi być dopasowana indywidualnie do pacjenta z zastosowaniem terapeutycznego monitorowania stężeniem leku (TML). TAC praktycznie całkowicie wiąże się z erytrocytami, dlatego w rutynowej praktyce klinicznej, oznacza się ilościowo progowe stężenie leku w pełnej krwi, tj. stężenie TAC przed przyjęciem porannej dawki leku (C_0), które powinno mieścić się w zakresie terapeutycznym 5-20 ng/ml.

Innym lekiem równie często stosowanym w terapeutycznym schemacie immunosupresyjnym jest inhibitor dehydrogenazy inozynomonofosforanowej (IMPDH), mykofenolan mofetylu (MMF), który jest prolekiem kwasu mykofenolowego (MPA). Monitorowanie stężeń tego leku nie jest wykonywane rutynowo we wszystkich ośrodkach transplantacyjnych, nie mniej jednak jest rekomendowane ze względu na konieczność uniknięcia działań niepożądanych (toksyczność wobec szpiku kostnego, czy uporczywe biegunki). Pomimo tego, że przebieg farmakokinetyki MPA ma charakter liniowy, duża zmienność wewnątrzsobnicza i międzysobnicza dodatkowo uzasadnia jego terapeutyczne monitorowanie. MPA wiąże się w dużym stopniu z białkami osocza i dlatego to ta frakcja krwi jest rekomendowaną matrycą biologiczną, w której oznacza się stężenie C_0 . Wartości stężeń C_0 powinny mieścić się w przedziale powinno mieścić się w zakresie 1-3,5 $\mu\text{g/ml}$.

W związku z tym, że TML oparte jest na częstych pobraniach próbek krwi, poszukuje się alternatywnej formy uzyskiwania materiału biologicznego, szczególnie dla dzieci, u których klasyczne pobranie jest wyjątkowo trudne i bolesne. Niedawno wprowadzona technika

mikropróbki objętościowo-absorpcyjnego (VAMS) pozwala na pobranie określonej, relatywnie niewielkiej objętości krwi (10 - 30 μ l), po nakłuciu palca lancetem, podobnie jak przy standardowym pomiarze glikemii. Pobrana próbka po suszeniu i użyciu odpowiednich odczynników ekstrakcyjnych poddawana jest właściwemu procesowi analitycznemu, najczęściej w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Dodatkowo, technika VAMS jest uznawana za niezależną od indywidualnego poziomu hematokrytu, w przeciwieństwie do bardziej popularnej techniki suchej plamy krwi (DBS, ang. *dried blood spot*).

Ze względu na specyfikę prowadzenia terapii immunosupresyjnej u pediatrycznych biorców przeszczepu nerki, nadrzędnym celem przedstawionej dysertacji było **opracowanie metod analitycznych LC-MS/MS służących oznaczaniu TAC i MPA w próbkach krwi włósniczkowej pobranej metodą VAMS w populacji pediatrycznej po przeszczepieniu nerki.**

Powyższy nadrzędny cel dopełniają cele szczegółowe: optymalizacja strategii pobrania materiału metodą VAMS u dzieci, dobranie warunków związanych z przygotowaniem próbki do oznaczenia LC-MS/MS, optymalizacja warunków chromatograficznych i pracy detektora MS, walidacja metod analitycznych LC-MS/MS oznaczania TAC w pełnej krwi i VAMS, oraz MPA w pełnej krwi, osoczu i VAMS, zgodnie z wytycznymi międzynarodowymi Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA). Dodatkowo, celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było badanie stabilności analitu w próbnikach VAMS w różnych warunkach przechowywania, ewaluacja potencjalnego, niepożądanego efektu hematokrytowego, jak również walidacja krzyżowa i kliniczna z rutynowo stosowanymi metodami oznaczania tych leków w diagnostyce laboratoryjnej.

Zaplanowane metody analityczne LC-MS/MS zostały z powodzeniem zwalidowane w odpowiednich zakresach kalibracji, zarówno dla TAC (0-60 ng/ml), jak również w przypadku MPA (0-15 μ g/ml). Wyznaczone parametry walidacyjne spełniły kryteria akceptacji określone w wytycznych EMA i Międzynarodowego Towarzystwa Terapeutycznego Monitorowania Leków i Toksykologii Klinicznej (ang. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, IATDM&CT). W przypadku walidacji metod wykorzystujących VAMS nie zauważono wpływu poziomu hematokrytu na odzysk analitu z matrycy biologicznej. Opracowane metody zostały z powodzeniem wykorzystane w oznaczeniu stężeń TAC i MPA w próbkach pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki (n=50). Opisane protokoły walidacyjne zostały poddane walidacji krzyżowej, co dowiodło równoważności metod wykorzystujących pełną krew i VAMS dla TAC oraz MPA.

Dodatkowo, ze względu na różnice w poziomach stężeń w osoczu i próbkach VAMS dokonano walidacji modelu korygującego stężenie z zastosowaniem regresji liniowej, co umożliwia przeliczenie uzyskanego stężenia MPA oznaczonego w próbkach pobranych metodą VAMS, na przewidywane stężenie w osoczu. Jest to niezwykle ważne, że względu na fakt, iż obecne zakresy terapeutyczne dotyczą stężeń MPA w osoczu. Niniejszy model został dodatkowo zweryfikowany na grupie niezależnych próbek VAMS, co pozwoliło na uzyskanie pierwszej jak dotąd opisanej w literaturze formuły korelacyjnej spełniającej rygorystyczne kryteria akceptacji sformułowane przez IATDM&CT.

Prezentowana dysertacja oparta została na monotematycznym cyklu trzech publikacji, w tym dwóch prac eksperymentalnych, które w sposób wyczerpujący opisują opracowane metody LC-MS/MS oznaczania TAC i MPA, ich walidację analityczną, krzyżową i kliniczną. Opracowane protokoły analityczne zostały z powodzeniem zastosowane w terapeutycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych u pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) w Warszawie.

Technika VAMS stwarza nowe możliwości w TML, nie tylko w przypadku leków immunosupresyjnych. Zarówno zalecenia producenta, jak i wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej świadczą o wysokiej stabilności pobranych próbek w różnych warunkach, co umożliwia samodzielne pobieranie próbek przez pacjenta lub jego opiekuna w domu bez obecności wykwalifikowanego personelu medycznego. Pobrana próbka po odpowiednim zabezpieczeniu może zostać przekazana do laboratorium diagnostycznego, a uzyskany wynik i rekomendacje terapeutyczne mogą zostać przekazane przez lekarza prowadzącego narzędziami teleinformatycznymi.

Technika VAMS może zostać użyta jako pewnego rodzaju strategia motywacyjna dla młodych pacjentów w zakresie przestrzegania zaleceń terapeutycznych, umożliwiającą częstsze kontrolowanie parametru C_0 leków immunosupresyjnych, którego fluktuacje są bezpośrednią konsekwencją zjawiska *non-adherence*. Dodatkowo zastosowanie VAMS w codziennej praktyce wydaje się atrakcyjne ze względu na niedawne ograniczenia w dostępie do opieki zdrowotnej w czasie pandemii SARS-CoV-2, jak również ze względu na nierzadkie trudności logistyczne z którymi muszą radzić sobie pacjenci i ich rodziny (jedyne pediatryczne ośrodek transplantacyjny w Polsce to IPCZD).

Według najlepszej wiedzy, opisane w niniejszej pracy zastosowanie techniki VAMS w populacji pediatrycznej w celu monitorowania leków immunosupresyjnych jest jednym z pierwszych opisanych w literaturze. Należy mieć nadzieję, że zapoczątkuje to szeroką optymalizację farmakoterapii i TML w oparciu o techniki mikropróbkiowania.

2. ABSTRACT

Transplantation is considered the best option for renal replacement therapy, particularly for end-stage renal failure. In addition to difficulties arising from organ availability and surgical or immunological aspects, tools are still being sought to optimize the best immunosuppressive therapy necessary for the rest of the patient's life. Particular difficulties are observed in pediatric patients, where non-adherence to therapeutic recommendations, mainly concerning medication intake, is the cause of more than 70% of rejection episodes in the first year after transplantation.

The cornerstone of immunosuppressive treatment is tacrolimus (TAC), a macrolide antibiotic, with a narrow range of therapeutic concentrations. Another problem is the high variability in individual response to the drug (intraindividual variability) and the difficulty in establishing appropriate population algorithms for matching drug doses (interindividual variability). This means that the drug dose must be adjusted individually for the patient based on therapeutic drug monitoring (TDM). TAC binds almost entirely to erythrocytes; therefore, in routine clinical practice, a threshold whole-blood concentration of the drug is quantified, that is, the TAC concentration before the daily dose of the drug (C_0), which should be within the therapeutic range of 5-20 ng/ml.

Another drug equally often used in a therapeutic immunosuppressive regimen is the inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitor- mycophenolate mofetil (MMF), which is a prodrug of mycophenolic acid (MPA). Monitoring of the concentration of this drug is not performed in some transplant centers but is recommended because of the need to avoid adverse effects (bone marrow or gastrointestinal toxicity). Although the pharmacokinetics of MPA are assumed to be linear, the high intra- and inter-individual variability argue in favor of determining the concentration of this drug. MPA binds extensively to plasma proteins, making this blood fraction the recommended biological matrix to determine C_0 concentrations, which are assumed to be 1-3,5 $\mu\text{g/ml}$.

As TDM is based on frequent blood sampling, an alternative method of obtaining biological material is being sought, especially for children for whom the classical collection is challenging and painful. The recently introduced volumetric-absorptive microsampling (VAMS) technique allows a defined, relatively small volume of blood to be collected (10 – 30 μl) after puncturing the finger with a lancet, similar to standard blood glucose measurement. After drying and using appropriate extraction reagents, the collected samples were subjected to an appropriate analytical process, usually based on high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Additionally, the

VAMS technique is considered to be independent of individual hematocrit levels, in contrast to the more popular dried blood spot (DBS) technique.

Given the specificity of administering immunosuppressive therapy to pediatric renal transplant recipients, the overarching aim of this dissertation was to develop LC-MS/MS analytical methods for determining TAC and MPA in capillary blood samples collected by VAMS in the pediatric renal transplant population.

This main aim is supported by the specific objectives: optimization of the collection strategy for VAMS in children, selection of conditions related to sample preparation for LC-MS/MS determination, optimization of chromatographic and MS detector conditions, validation of LC-MS/MS analytical methods for the determination of TAC in whole blood and VAMS, and MPA in whole blood, plasma, and VAMS, following the European Medicines Agency (EMA) international guidelines. In addition, this dissertation aimed to study the stability of VAMS samplers under different storage conditions to evaluate potential adverse hematocrit effects, cross-validation, and clinical validation with routinely used laboratory diagnostics methods.

The planned LC-MS/MS analytical methods were successfully validated within the calibration ranges for TAC (0-60 ng/ml) and MPA (0-15 µg/ml). The validation parameters met the acceptance criteria of the EMA and the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDM&CT) guidelines. For the validation of the VAMS-based methods, no effect of hematocrit level on analyte recovery from the biological matrix was observed. The developed methods determined TAC and MPA concentrations in samples from pediatric renal transplant patients (n=50). The described validation protocols were cross-validated, proving the equivalence of the whole blood and VAMS-based methods for TAC and MPA. In addition, owing to differences in plasma and VAMS sample concentrations, a concentration-correction model based on statistical regression was validated, allowing the resulting MPA concentration determined in the VAMS samples to be converted to the predicted plasma concentration. This is extremely important because the current therapeutic range characterizes the plasma MPA concentrations.

This model was further validated on a group of independent VAMS samples, resulting in the first correlation formula described in the literature that meets the stringent acceptance criteria formulated by IATDM&CT.

The dissertation presented here is based on a monothematic series of three publications, including two experimental papers, which comprehensively describe the LC-MS/MS methods developed for determining TAC and MPA, their analytical, cross-validation, and clinical

validation. The developed analytical protocols have been successfully applied to the therapeutic monitoring of immunosuppressive drugs in pediatric renal transplant patients treated at the Children Memorial Health Institute (CMHI) in Warsaw.

The VAMS technique offers new possibilities for TDM, and not only for immunosuppressive drugs. Both the manufacturer's recommendations and the results presented in this dissertation testify to the long-term stability of the collected samples under various conditions, allowing for self-sampling by the patients or their caregivers at home without qualified medical personnel. Once properly secured, the collected sample can be transferred to a diagnostic laboratory, and the attending physician can communicate the obtained results and therapeutic recommendations via communication and information systems.

The VAMS technique can be used as a motivational strategy for young patients regarding therapeutic adherence, enabling more frequent monitoring of the C_0 parameter of immunosuppressive drugs, whose fluctuations are a direct consequence of the non-adherence phenomenon. In addition, the use of VAMS in daily practice seems attractive because of recent limitations in access to health care during the SARS-CoV-2 pandemic, as well as the logistical difficulties faced by patients and their families (the only pediatric transplant center in Poland is the CMHI).

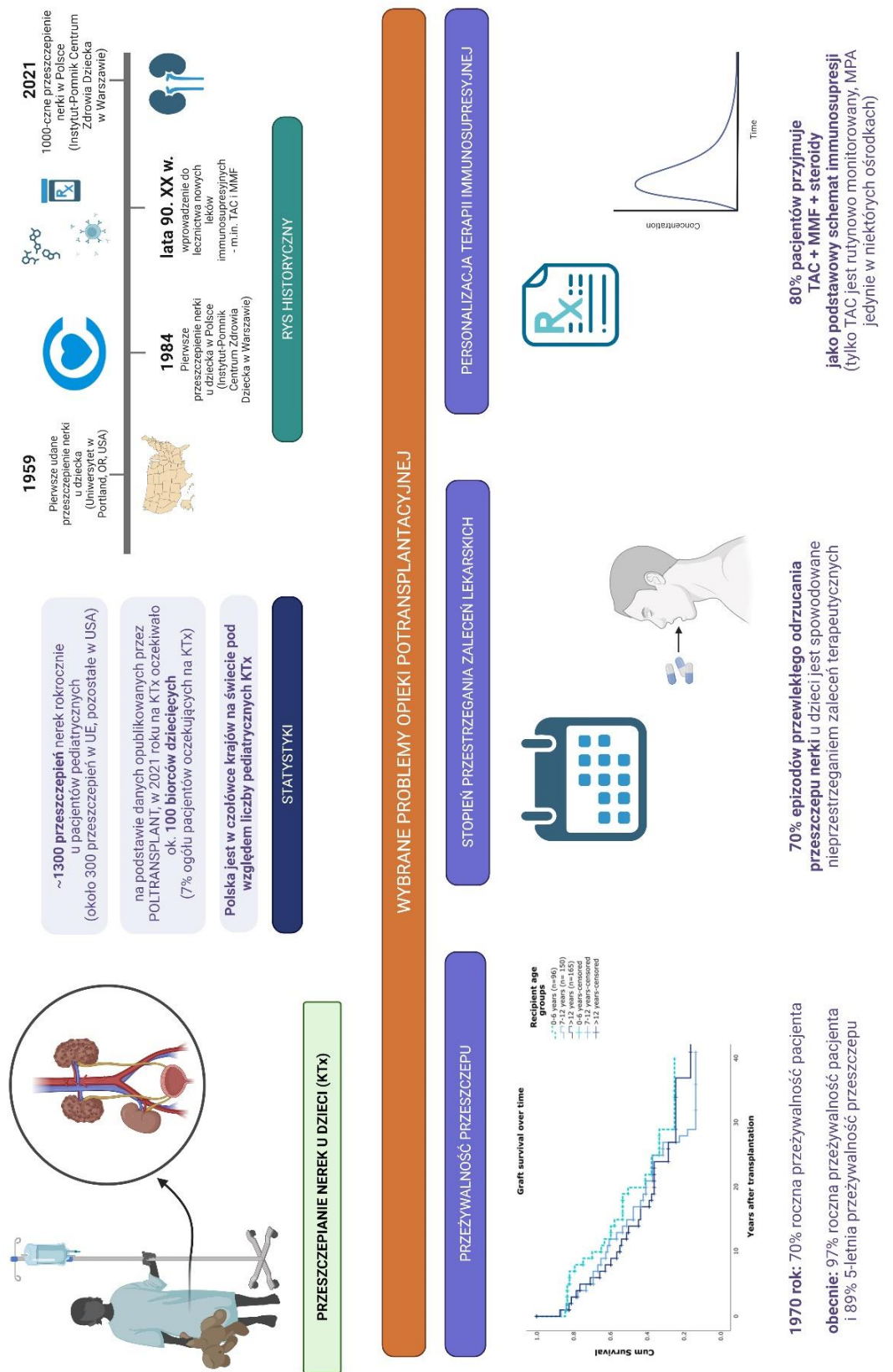
To the best of our knowledge, the application of the VAMS technique to monitor immunosuppressive drugs in the pediatric population described in this paper is one of the first described in the literature. Hopefully, this will begin the widespread optimization of pharmacotherapy and TDM based on microsampling techniques.

3. WPROWADZENIE

Przeszczepienie narządowe jest złotym standardem terapii nerkozastępczej w przypadku pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (ESRD) [1]. Transplantację nerki (ang. *kidney transplantation*, KTx) należy traktować jako korzystną procedurę, szczególnie w grupie pacjentów pediatrycznych, która w przeciwieństwie do przewlekłych dializ, zapewnia lepszą jakość życia, a w konsekwencji je wydłuża [1,2]. W tej ratującej życie procedurze niewydolną nerkę zastępuje się całkowicie zdrową nerką od żywego lub zmarłego dawcy. Obecnie przeszczep nerki jest najczęściej wykonywanym zabiegiem transplantacyjnym na świecie, a w przypadku pacjentów pediatrycznych, rokrocznie przeszczepia się ponad 1300 sztuk tego narządu [2,3]. W Polsce jedynym ośrodkiem transplantacyjnym referencyjnym dla pacjentów pediatrycznych jest Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) w Warszawie, gdzie w 1984 roku dokonano pierwszej transplantacji nerki u dziecka w naszym kraju. Od tego momentu, w Instytucie przeszczepiono ponad 1100 nerek, co stawia ten ośrodek w czołówce europejskiej pod względem liczby wykonanych zabiegów tego typu [4]. Na ryc. 1 przedstawiono wybrane aspekty historyczne i dane statystyczne w odniesieniu do transplantacji nerek u dzieci [1-4].

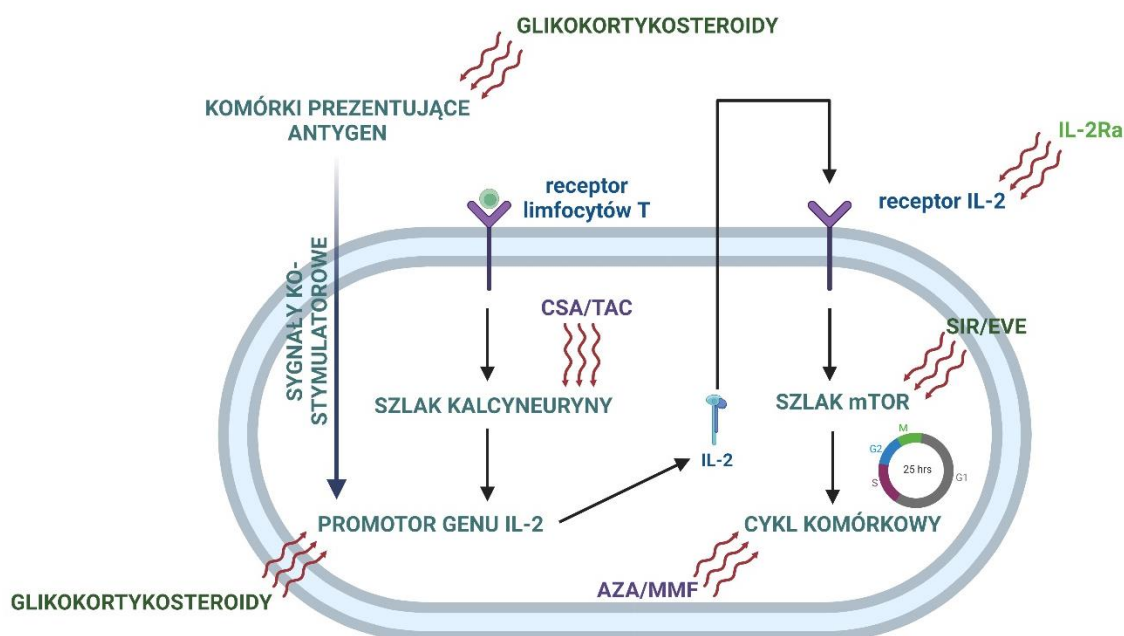
Opieka nad pacjentami pediatrycznymi znacząco różni się od leczenia dorosłych biorców nerki, ze względu na różnice wynikające ze stopnia przestrzegania zaleceń terapeutycznych (tzw. *adherence*), osobniczej odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne czy powikłań potransplantacyjnych [3,5]. Wybrane problemy opieki potransplantacyjnej nad pacjentami wieku dziecięcego (<18 lat) zostały przedstawione na ryc. 1. Na wartość stężenia leków immunosupresyjnych u dzieci wpływ ma bardzo wiele czynników, działających na wszystkich etapach farmakokinetyki leku tj. wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji [6]. Szczególną rolę odgrywa dojrzewanie wraz z wiekiem dziecka aktywności układów enzymatycznych odpowiedzialnych za wchłanianie i metabolizm leków, liczne interakcje z lekami często stosowanymi w populacji pediatrycznej (np. inhibitory pompy protonowej czy antybiotyki makrolidowe), różne stany kliniczne, np. biegunka czy odwodnienie [3, 5-6].

Optymalna terapia immunosupresyjna jest jednym z najważniejszych czynników w opiece nad dziećmi po KTx, od którego zależy odległy los pacjenta i przeszczepu [7]. Dobór odpowiedniej dawki leku na podstawie uzyskanych stężeń jest szczególnie trudny w tej grupie pacjentów ze względu na dużą zmienność farmakokinetyki leków związaną z wiekiem, interakcje z wieloma lekami powszechnie stosowanymi w populacji pediatrycznej oraz zjawisko braku przestrzegania zaleceń lekarskich (ang. *medical non-adherence*, MNA) [4,7-8].



Rycina 1. Infografika przedstawiająca dane statystyczne i historyczne oraz wybrane problemy opieki potransplantacyjnej dla procedury przeszczepiania nerek (KTx) u pacjentów pediatrycznych. Przygotowano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.

Do najważniejszych leków immunosupresyjnych stosowanych obecnie w transplantologii zaliczamy leki działające na immunofiliny, inhibitory szlaku proliferacji oraz leki glikokortykosteroidowe (GKS) i biologiczne [8]. Najważniejsze z nich to inhibitory kalcyneuryny (ang. *calcineurin inhibitors*, CNI), działające na immunofiliny, do których zaliczamy cyklosporynę A (ang. *ciclosporin A*, CSA) oraz takrolimus (ang. *tacrolimus*, TAC). Ostatni z nich uznawany jest za kamień milowy współczesnej terapii immunosupresyjnej [9]. Do rzadziej stosowanych w transplantologii pediatrycznej zaliczane są inhibitory kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin inhibitors*), do których można zaklasyfikować sirolimus (SIR, rapamycyna) oraz ewerolimus (EVE). Wśród leków antyproliferacyjnych wyodrębnić można leki działające bezpośrednio na cykl komórkowy, tj. coraz rzadziej stosowaną azatioprynę (AZA) oraz pośrednio działający na ten szlak mykofenolan mofetylu (MMF). Często stosowanym uzupełnieniem schematu farmakoterapeutycznego, szczególnie w początkowej fazie terapii po przeszczepieniu nerki są GKS. W początkowej fazie leczenia, w ramach tzw. leczenia indukcyjnego, stosuje się leki biologiczne (np. induktory interleukiny-2). Molekularne punkty uchwytu działania wymienionych leków immunosupresyjnych, będące ich celami farmakodynamicznymi, przedstawiono schematycznie na ryc. 2.



Rycina 2. Cele farmakodynamiczne leków immunosupresyjnych na poziomie komórkowym (molekularnym). Objaśnienia skrótów: AZA– azatiopryna, CSA– cyklosporyna A, EVE– ewerolimus, IL-2– interleukina 2, IL-2Ra – induktor IL-2, SIR– sirolimus, TAC– takrolimus. Przygotowano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.

Wymienione leki immunosupresyjne (z wyjątkiem MMF) są lekami charakteryzującymi się wąskim przedziałem terapeutycznych stężeń (ang. *narrow therapeutic index drugs*, NTID), co oznacza konieczność prowadzenia terapii monitorowanej stężeniem leku (TML, ang. *therapeutic drug monitoring*, TDM) we krwi u pacjentów leczonych preparatami tego typu [8-10]. Duża zmienność międzypersonnicza (aspekty farmakokinetyczne) i wewnątrzpersonnicza (aspekty farmakogenetyczne), jak również zróżnicowany metabolizm w indywidualnym przypadku zdecydowanie przemawiają za indywidualizacją terapii, zgodnie z twierdzeniem, że jednej dawki nie można zastosować u każdego pacjenta (ang. *one dose does not fit all*) [9]. Zastosowanie TML w praktyce klinicznej pozwalana na takie dopasowanie dawki leku immunosupresyjnego, by utrzymywało się ono w odpowiednim oknie terapeutycznym – zbyt mała dawka (ang. *underdosing*) może odpowiadać w dłuższej perspektywie za przewlekłe odrzucanie narządu, natomiast wysoka dawka leku (ang. *overdosing*) odpowiada za wspomniane wcześniej działania niepożądane związane z przyjmowaniem preparatu [10-11].

Obecnie, najczęściej stosowanym schematem lekowym w terapii immunosupresyjnej jest połączenie TAC i MMF z ewentualnym wczesnym włączeniem dawki leków steroidowych. Jest on stosowany u ponad 80% dzieci po przeszczepieniu nerki, a jego skuteczność została udowodniona m.in. w wieloośrodkowym randomizowanym badaniu klinicznym TWIST przeprowadzonym w populacji pediatrycznej [12]. Ewentualne modyfikacje tego schematu terapeutycznego są bezpośrednio zależne od osobniczego ryzyka immunologicznego pacjenta [5,8,12].

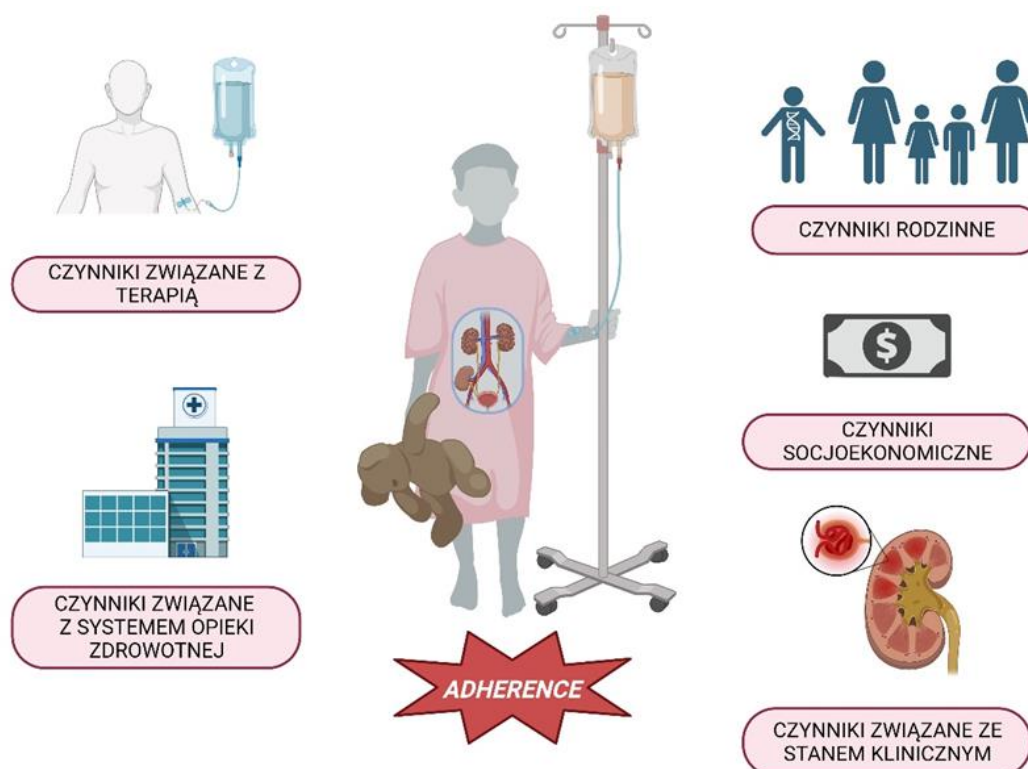
TAC jest antybiotykiem makrolidowym hamującym powstawanie limfocytów cytotoksycznych, odpowiedzialnych głównie za odrzucenie przeszczepu, który został po raz pierwszy wyizolowany z gatunku grzyba *Streptomyces tsukubaensis* [9]. Dodatkowo, jest odpowiedzialny za hamowanie aktywacji limfocytów T, proliferację limfocytów B zależną od limfocytów T pomocniczych, tworzenie limfokin (m.in. interleukiny-2, -3, interferonu gamma) oraz ekspresję receptora interleukiny-2 [8,9]. Takrolimus jest lekiem o dużej wewnątrz- i międzypersonniczej zmienności farmakokinetyki i jest podatny na interakcje z innymi lekami [9]. Stężenie minimalne (C_0), zwane również stężeniem przed podaniem kolejnej dawki leku, jest rutynowym parametrem stosowanym w terapeutycznym monitorowaniu TAC w klinikach [9,11]. Dawkę takrolimusu dobiera się tak, aby C_0 mieściło się w wąskim zakresie terapeutycznym (5-20 ng/ml) [8-12].

MMF, stosowany jako prolek kwasu mykofenolowego (MPA) jest inhibitorem dehydrogenazy inozynomonofosforanowej (IMPDH) wyizolowanym z gatunku grzyba *Penicillium stoloniferum* [13]. Mechanizm działania immunosupresyjnego MPA polega na pośrednim hamowaniu cyklu komórkowego, a tym samym syntezy DNA. Ponadto, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁, lek ten zapobiega proliferacji limfocytów B i T. Enzym IMPDH jest odpowiedzialny za syntezę purynowych nukleotydów w szlaku *de novo*, szczególnie w komórkach limfocytów (typu B i T) [8,10,13]. Farmakokinetykę MPA przyjmuje się jako liniową w klasycznym zakresie dawkowania podanym w wytycznych [13]. Po podaniu doustnym maksymalne stężenie MPA utrzymuje się we krwi przez około godzinę. Następnie stężenie stopniowo zmniejsza się, ponieważ lek podlega eliminacji z organizmu, ale drugi szczyt stężenia leku można zaobserwować w organizmie po około 6-12 godzinach, co jest wynikiem krążenia jelitowo-wątrobowego. W wyniku tego procesu MPAG (glukuronid kwasu mykofenolowego) obecny w żółci rozprzega się do wolnego MPA przy udziale glukuronidaz w jelitach [8, 13]. Warto zauważyć, że w wyniku tego procesu stężenie MPA przed kolejnym podaniem leku nie odpowiada już najniższemu stężeniu leku (C_{min}) we krwi. Chociaż lek ten nie należy do NTID, to monitorowanie stężeń MPA w praktyce klinicznej jest rekomendowane w celu ograniczenia działań niepożądanych (głównie związanych z toksycznością w stosunku do układu pokarmowego i szpiku kostnego) [13-15]. Leczenie tym lekiem jest monitorowane poprzez pomiar stężenia MPA w osoczu które powinno wynosić od 1 do 3,5 µg/ml przed podaniem kolejnej dawki [8,13,14]. Według rekomendacji IATDM&CT, zalecane jest zastosowanie parametru farmakokinetycznego AUC₀₋₁₂ jako wskaźnika ekspozycji na MPA w terapii łączonej z CNI [15]. Jednakże, ze względu na trudności w przeprowadzeniu odpowiedniej ilości pobrań krwi w czasie rutynowych wizyt kontrolnych, jak również z przyczyn etycznych, oznaczanie tego parametru jest praktycznie niemożliwe do wykonania u pediatrycznych biorców nerki. Stąd, alternatywnie wyznacza się parametr C₀, jako parametr zastępczy w stosunku do AUC, który pozwala dobrać odpowiednią dawkę leku, by uniknąć działań niepożądanych czy epizodów odrzucania przeszczepionej nerki [8,15].

Udowodniono, że utrzymanie stężenia leków w zakresie terapeutycznym zapewnia optymalne wyniki przeszczepiania tj. skutecznie zapobiega odrzucaniu przeszczepu, przy współwystępowaniu działań niepożądanych o umiarkowanym natężeniu. Najlepsze rokowanie dotyczy pacjentów, u których stężenie leków immunosupresyjnych w odległej

obserwacji jest stabilne, co pośrednio świadczy też o przestrzeganiu zaleceń w odniesieniu do dawkowania leków [3,9,11].

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) definiuje zależność MNA od czterech czynników na poziomach: indywidualnym, rodzinnym, systemu opieki zdrowotnej oraz socjoekonomicznym (ryc. 3) [3,16,17]. Jakkolwiek udział tych czynników w ogólnym MNA jest różny w osobniczym przypadku, to sposób zapobiegania temu niekorzystnemu klinicznie zjawisku obejmuje ogólnopojętą kontrolowanie przebiegu terapii, jak również gruntowną edukację chorego [5]. Do prostych narzędzi pozwalających na monitorowanie poziomu przestrzegania zaleceń terapeutycznych należą: bezpośrednia obserwacja stanu klinicznego, elektroniczny monitoring farmakoterapii połączony z liczeniem tabletek, dzienniczek przyjmowania leków, czy rejestracja przyjmowania leku z wykorzystaniem narzędzi teleinformatycznych [16-19]. Działaniami obciążonymi mniejszym błędem określenia MNA jest wywiad kliniczny przeprowadzony przez lekarza prowadzącego połączony z terapeutycznym monitorowaniem stężeń leków immunosupresyjnych we krwi [17,20].

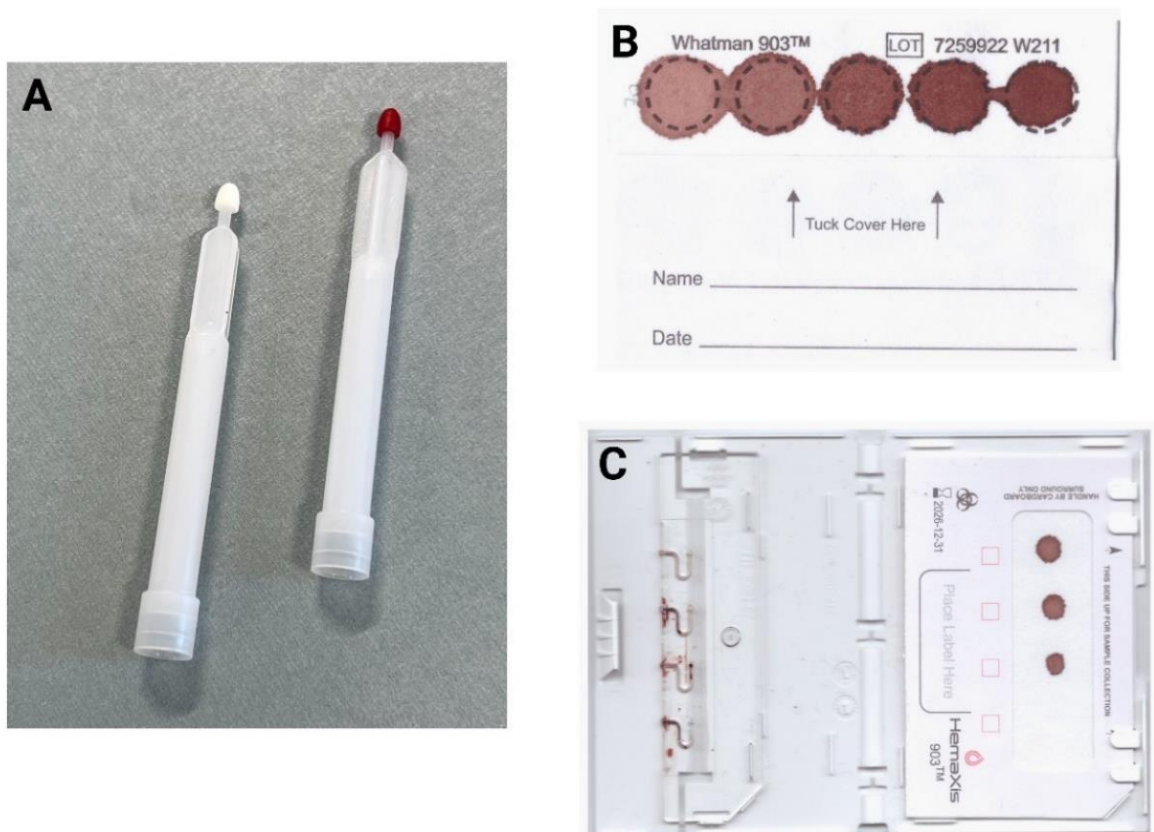


Rycina 3. Czynniki wpływające na poziom przestrzegania zaleceń lekarskich (adherence) w populacji pediatrycznej. Przygotowano przy użyciu oprogramowania BioRender.com.

W ostatnich latach dąży się w bioanalizie klinicznej (również w TML) do uproszczenia metod oznaczeń analitów, jak również automatyzacji procesów analitycznych, czy miniaturyzacji urządzeń do pobierania materiału biologicznego [21,22]. Obserwowane trendy są szczególnie ważne dla fazy przedanalitycznej (pobieranie, przechowywanie i transport próbek), jak i fazy analitycznej (obróbka i analiza materiału biologicznego). Najbardziej krytyczną częścią procesu analitycznego jest wybór odpowiedniej metody pobierania próbek. Klasyczne pobranie z nakłucia żyły obwodowej jakkolwiek pozwala na uzyskanie odpowiedniej i reprezentatywnej ilości materiału biologicznego, jednak jest bolesne i często trudne do wykonania u pacjentów pediatrycznych [23]. Alternatywnie, zastosować można jedną z najpopularniejszych technik mikropóbkowania – suchą plamkę krwi (ang. *dried blood spot*, DBS), która jest mniej bolesna, łatwiejsza w samodzielnym użyciu, a w konsekwencji tańsza [23-24]. Z drugiej strony metoda ta charakteryzuje się dużą zmiennością dotyczącą objętości pobranego materiału, ograniczoną powtarzalnością zależną od poziomu hematokrytu (HT) w osobniczym przypadku [25]. Dodatkowo, dla tej metody znamienne są efekty wulkaniczne czy chromatograficzne związane odpowiednio ze słabą jednorodnością próbki oraz rozdziałem krwi na część morfotyczną i osocze w miejscu naniesienia na bibułę [24]. Z tego powodu metoda ta nie jest najlepsza do monitorowania terapeutycznego leków immunosupresyjnych o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń [23-24, 26].

Niedawno wprowadzone urządzenie do pobierania próbek o małej objętości, Mitra™ (Trajan®/Neoteryx®, Torrance, CA, USA), oparte na technice mikropóbkowania objętościowo-absorpcyjnego (VAMS), umożliwia dokładne i precyzyjne pobranie określonej objętości krwi [21-22,27]. Porównanie wyglądu próbników Mitra™ (ryc. 4A) z systemami opartymi na technice DBS przedstawiono na ryc. 4 (ryc. 4B system nieobjętościowy DBS, ryc. 4C objętościowy system DBS). Próbniki Mitra™ są przeznaczone do pobierania dokładnej objętości materiału biologicznego, a mianowicie: końcówka o objętości 10µl jest powszechnie używana do monitorowania leków i związków drobnocząsteczkowych (ryc. 4A), końcówki 20µl mogą być używane do oznaczeń większych cząsteczek biologicznych, np. lipidów czy białek, podczas gdy próbki o objętości pobrania 30µl stosowane są w diagnostyce molekularnej (np. ekstrakcji materiału genetycznego) [21]. Technika ta umożliwia samodzielne pobranie krwi włóśniczkowej z opuszki palca, podobnie jak to ma miejsce przy pomiarze glikemii (nawet w warunkach domowych, samodzielnie lub w obecności opiekuna, bez

wykwalifikowanego personelu medycznego). Pobranie materiału jest proste i praktycznie bezbolesne. Pobrany w ten sposób materiał o niewielkiej objętości (praktycznie 200 razy mniejszej niż przy klasycznym pobraniu) jest stabilny po wyschnięciu przez co najmniej kilka tygodni, nie wymaga szczególnych warunków przechowywania, może być wysłany tradycyjną drogą pocztową do laboratorium diagnostycznego [28]. Technika ta ma kilka zalet, które są szczególnie istotne w populacji dziecięcej: małoinwazyjne pobranie krwi przez opiekuna (możliwe także w warunkach domowych), brak konieczności nakłuwania żyły obwodowej (co bywa trudne u małych pacjentów, po wcześniejszych licznych kaniulacjach żył) i minimalna objętość pobieranej krwi (10-30 μ L). Dzięki temu możliwe jest częstsze pobieranie materiału i przesyłanie go pocztą (co ma szczególne znaczenie np. w czasie zagrożenia epidemicznego, bądź w przypadku ośrodka referencyjnego oddalonego znacznie od miejsca pobrania próbki w warunkach domowych) [28-29].

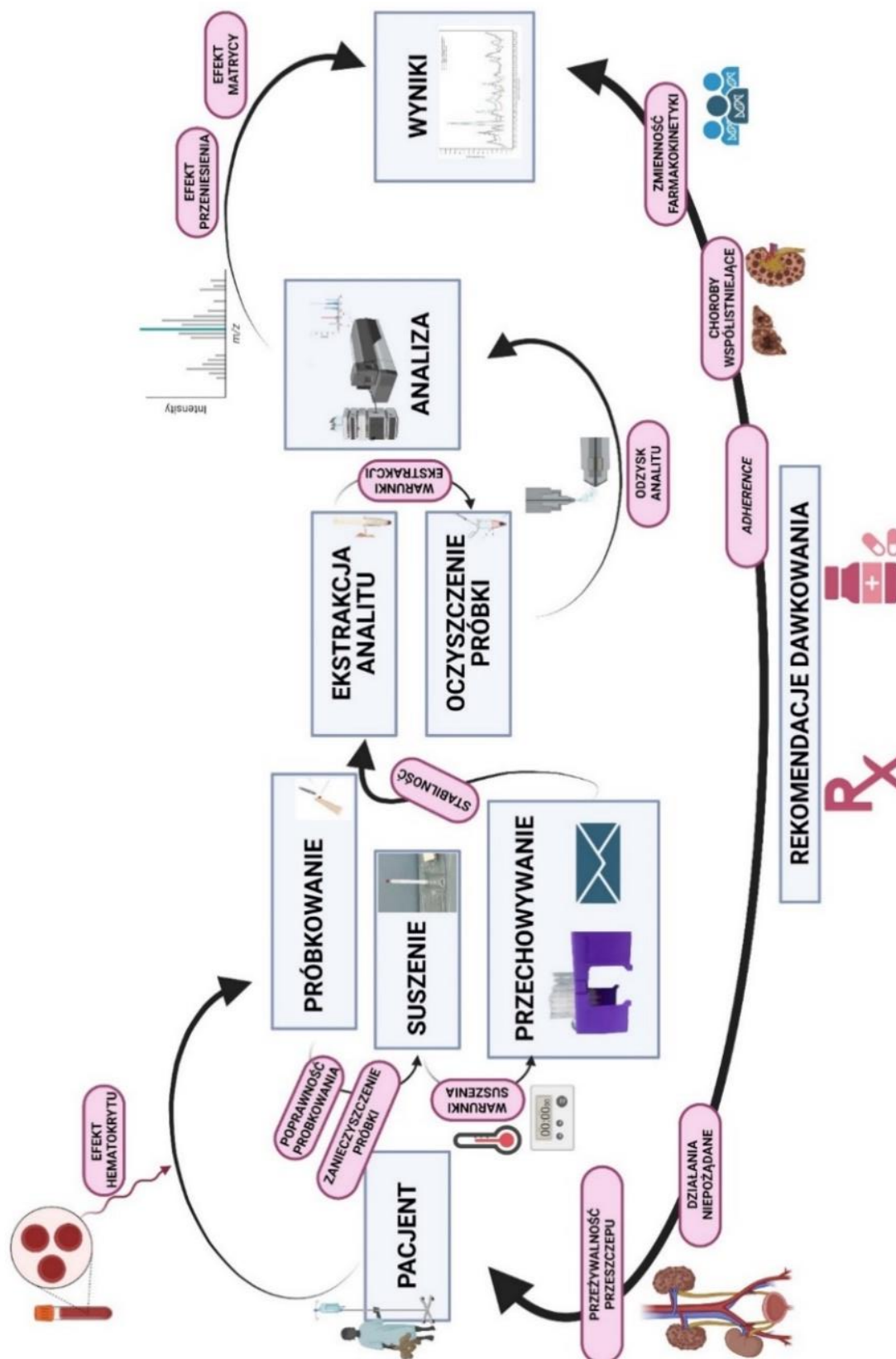


Rycina 4. Wybrane narzędzia służące do mikropóbkowania – A (próbki Mitra™), B (bibuła Whatman 903™), C (system HemaXis 903™). Zdjęcia pochodzą ze zbiorów własnych i prac laboratoryjnych autora niniejszej dysertacji.

Z punktu widzenia bioanalitycznego, stosowanie techniki VAMS zmniejsza niekorzystny efekt hematokrytu (HE), zwiększa dokładność objętości pobranej próbki, wreszcie wyniki skorelowane są z dawką i ekspozycją na lek [25-26, 28-29]. Urządzenia Mitra™ są przeznaczone do przeprowadzenia analizy w laboratoriach o ograniczonym wyposażeniu w aparaturę. Możliwa jest ekstrakcja zwykłym, prostym rozpuszczalnikiem (np. wodą czy metanolem), nie ma potrzeby przechowywania w szczególnych warunkach, czy konieczności wstępnej obróbki materiału w celu uzyskania określonej frakcji krwi [28-29].

Próbnik VAMS, którym pobierana zostaje krew po nakłuciu palca pacjenta, musi zostać pozostawiony do wyschnięcia, w celu osiągnięcia odpowiedniej stabilności [28]. Na tym etapie potencjalne interferencje jak warunki przechowywania i czas suszenia mogą mieć istotny wpływ na późniejszy wynik analityczny. Jakkolwiek zakłada się, na podstawie danych producenta, że technika ta jest niezależna od HE, jednak zaleca się ewaluację tego potencjalnego problemu na poziomie opracowywania i walidacji metody [24, 28-29]. Należy zwrócić szczególną uwagę na poprawność pobierania próbek, oraz ewentualne zanieczyszczenia samego próbnika. Wykazano, że pobieranie próbek przez wykwalifikowany personel medyczny jest obarczone mniejszym błędem związanym z pobraniem, aniżeli samodzielne pobranie przez pacjenta lub przy pomocy opiekuna [28-29]. Jednocześnie zakłada się, że odpowiednie przeszkolenie pacjenta, jak również kontrola próbek po otrzymaniu ich od pobierającego zapewnia ograniczenie tego błędu do minimum. Analit może być ekstrahowany prostymi rozpuszczalnikami w warunkach laboratoryjnych (np. wodą), a po odpowiednim przygotowaniu uzyskanego roztworu (np. poprzez odbiałczanie, ekstrakcję ciecz-ciecz) i uzyskaniu klarownego supernatantu, uzyskana próbka będzie gotowa do przeprowadzenia analizy za pomocą czulej, szybkiej i selektywnej techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [30]. Jest to metoda uznawana za referencyjną przez IATDM&CT w oznaczeniach TAC i MPA [31]. Według danych tego towarzystwa, ponad połowa laboratoriów stosuje tę technikę w rutynowych oznaczeniach poziomów stężeń leków immunosupresyjnych [9,13,31]. Główną zaletą tej metody jest wysoka selektywność i czułość analityczna oraz możliwość jednoczesnej, wysokoprzepustowej analizy wielu analitów połączonej z znacznym ograniczeniem objętości analizowanej próbki [30]. Projektowana metoda analityczna powinna być odpowiednio walidowana w oparciu o odpowiednie wytyczne, takie jak przewodnik walidacji metod bioanalitycznych

Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) [32]. Wyniki powinny zostać poddane walidacji krzyżowej, by udowodnić równoważność nowej metody z rutynowo stosowanymi protokołami analitycznymi [24,28,32]. Jeśli nie zostanie to udowodnione, to należy przeprowadzić pełną walidację kliniczną w celu opracowania równania pozwalającego na przeliczenie stężenia leku uzyskanego nowo opracowaną techniką, na przewidywane stężenie uzyskane techniką referencyjną [24]. Zapewnia to jednorodność terapeutyczną uzyskanych wyników analitycznych i możliwość prowadzenia farmakoterapii w oparciu o nowo opracowaną metodę, co jest szczególnie istotne przy niestosowanych jak dotąd rutynowo technikach pobierania materiału biologicznego od pacjenta, takich jak VAMS [29]. Inną sytuacją, w jakiej należy przeprowadzić pełny protokół walidacji klinicznej, jest problem zmiany matrycy biologicznej. Takim przykładem jest MPA, który silnie wiąże się z białkami, wskutek czego jego dystrybucja ogranicza się głównie do osocza [13,31]. Zastosowanie VAMS wymusza pobranie pełnej krwi włośniczkowej, a więc stężenie tego leku będzie w tej sytuacji mniejsze. Z tego powodu należy opracować model pozwalający na przewidywanie stężenia w klasycznie stosowanej matrycy (osocze), bazując na stężeniu oznaczonym w próbkach pobranych metodą VAMS [33]. Całościową problematykę zastosowania techniki VAMS w praktyce analitycznej i klinicznej zobrazowano na ryc. 5 [24,33-35].



Rycina 5. Wybrane aspekty wprowadzenia techniki mikropróbki do praktyki klinicznej – od fazy przedanalizy do fazy klinicznej. Na różowych polach przedstawiono punkty krytyczne, których prawidłowa ewaluacja zapewnia uzyskanie prawidłowego wyniku analitycznego i terapeutycznego.

4. CEL PRACY

Przełom jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci w zakresie strategii leczenia immunosupresyjnego nie byłby możliwy bez prowadzenia zindywidualizowanej terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi [8-9,13]. W związku z faktem, że możliwości wprowadzenia do leczenia nowych generacji leków immunosupresyjnych są mocno ograniczone, poszukuje się coraz skuteczniejszych strategii monitorowania farmakoterapii po przeszczepieniach narządów unaczynionych. Optymalna strategia monitorowania leku o wąskim przedziale terapeutycznych stężeń pozwala z jednej strony na ograniczenie działań niepożądanych wywołanych przez lek, z drugiej natomiast pozwala na zindywidualizowanie dawki leku na tyle, aby ryzyko odrzucenia przeszczepionego narządu było ograniczone do minimum [8,31]. Istotnym problemem klinicznym, obserwowanym w przypadku pediatrycznych biorców przeszczepu, jest zjawisko nieprzestrzegania zaleceń lekarskich (*non-adherence*), co uzasadnia potrzebę częstszego kontrolowania stężeń stosowanych leków immunosupresyjnych [3]. Tego typu kontrola może być prowadzona bez konieczności wizyty w ośrodku transplantacyjnym dzięki wykorzystaniu opisanego powyżej systemu typu VAMS. Jednakże, ze względu na innowacyjność tego narzędzia, należy przeprowadzić badania, które jednoznacznie potwierdzą użyteczność tego narzędzia w praktyce klinicznej. Jakkolwiek w trakcie realizacji prac laboratoryjnych wchodzących w zakres niniejszego badania naukowego, pojawiło się szereg prac opisujących opracowane metody analityczne służące oznaczeniu TAC i MPA w próbkach pobranych systemem VAMS, to żadna z nich nie opisywała jednoczesnego opracowania, walidacji i zastosowania klinicznego tych metod w populacji pediatrycznej [28,29].

Z tego powodu, nadrzędnym celem przedstawionej pracy doktorskiej opartej na monotematycznym cyklu publikacji, było **opracowanie metod analitycznych LC-MS/MS służących oznaczaniu TAC i MPA w próbkach krwi włośniczkowej pobranej metodą VAMS w populacji pediatrycznej po przeszczepieniu nerki.**

Powyższy cel nadrzędny został zrealizowany w trzech etapach, odpowiadających kolejno publikacjom P₁, P₂ i P₃, poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

ETAP I

Zbudowanie teoretycznych podstaw do zaplanowanych prac doświadczalnych – przegląd literaturowy – publikacja P₁

- ✓ Omówienie założeń teoretycznych terapii monitorowanej leków immunosupresyjnych (TAC, MPA, CSA, SIR, EVE), ze szczególnym uwzględnieniem głównych własności farmakokinetycznych tych leków.
- ✓ Porównanie najpopularniejszych strategii pobierania mikropórek w oparciu o mikropóbkowanie kapilarne, technikę suchej plamy krwi (DBS), jak również urządzenia Mitra™, Capitainer™, HemaXis™, hemaPen™.
- ✓ Przegląd literaturowy opublikowanych prac doświadczalnych opisujących zastosowanie techniki VAMS w praktycznym monitorowaniu leków immunosupresyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem etapów przed i po pobraniu próbki (włączając fazę analityczną i zastosowanie w praktyce klinicznej).
- ✓ Kompleksowy opis najważniejszych problemów związanych z techniką mikropóbkowania – efekt hematokrytu, czynniki krytyczne w fazie przedanalitycznej, jak i analitycznej. Zaproponowanie możliwości rozwiązania opisanych problemów w praktyce diagnostycznej.
- ✓ Zwrócenie uwagi na zjawisko nieprzestrzegania zaleceń lekarskich w populacji pediatrycznej – wskazanie technologii mikropóbkowania jako możliwej formy ograniczenia tego problemu.
- ✓ Uzasadnienie konieczności opracowania zewnętrznej kontroli wyników oznaczeń w ramach programu biegłości laboratoriów.

ETAP II

Opracowanie i walidacja metod LC-MS/MS służących oznaczeniu TAC w krwi pełnej i próbkach krwi włośniczkowej pobranych metodą VAMS – publikacja P₂

- ✓ Zaproponowanie strategii pobierania materiału do badań techniką VAMS w celu pomiaru stężenia C₀ w praktyce klinicznej – edukacja pacjentów i personelu medycznego.
- ✓ Wybór odpowiedniego standardu wewnętrznego (ASC *versus* ¹³C,₂-TAC) w metodzie oznaczania TAC metodą LC-MS/MS celem odpowiedniej kompensacji efektów matrycowych.
- ✓ Opracowanie warunków suszenia pobranej mikropróbki i metody ekstrakcji TAC z próbki VAMS, poprzez testowanie różnych warunków tego procesu (czas, temperatura, wytrząsanie, ultradźwięki, różne roztwory ekstrakcyjne).
- ✓ Opracowanie i walidacja zgodnie z wytycznymi EMA metody analitycznej pozwalającej na szybkie i dokładne oznaczenia TAC w próbkach krwi żyłnej jak i VAMS.
- ✓ Badanie stabilności próbek pobranych metodą VAMS w różnych warunkach przechowywania (temperatura pokojowa z dostępem światła i bez dostępu światła, 4°C i -20°C) – dane niepublikowane.
- ✓ Walidacja krzyżowa opracowanych metod, jak również z rutynowo stosowaną metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (ang. *chemiluminescent microparticle immunoassay*; CMIA) metodami statystycznymi – regresja Passinga-Babloka, ocena błędów metodą Blanda-Altmana, metody korelacyjne.
- ✓ Ocena efektu hematokrytowego poprzez porównanie poziomów stężeń TAC w próbkach krwi żyłnej i włośniczkowej (VAMS) z użyciem odpowiednich metod statystycznych (analiza korelacyjna).
- ✓ Zastosowanie opracowanych metod (WB-LC-MS/MS oraz VAMS-LC-MS/MS) w terapeutycznym monitorowaniu stężenia TAC we krwi pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki.

ETAP III

Opracowanie i walidacja metod LC-MS/MS służących oznaczeniu MPA w krwi pełnej osoczu i próbkach krwi włośniczkowej pobranych metodą VAMS – publikacja P₃

- ✓ Opracowanie i walidacja zgodnie z wytycznymi EMA metody analitycznej pozwalającej na szybkie i dokładne oznaczenia MPA w próbkach krwi żyłnej (ang. *whole blood*, WB), osoczu (ang. *plasma*, PL) i VAMS.
- ✓ Ewaluacja stabilności próbek pobranych metodą VAMS w różnych warunkach przechowywania (temperatura pokojowa z dostępem światła i bez dostępu światła, 4°C i -20°C).
- ✓ Walidacja krzyżowa opracowanych metod pomiędzy sobą, jak również z rutynowo stosowaną metodą chromatograficzną z diodową detekcją spektrofotometryczną (HPLC-DAD) metodami statystycznymi – regresja Passinga-Babloka, ocena błędu metodą Blanda-Altmana, metody korelacyjne.
- ✓ Ocena efektu hematokrytowego poprzez porównanie poziomów stężeń MPA w próbkach krwi żyłnej i włośniczkowej (VAMS) z użyciem odpowiednich metod statystycznych (analiza korelacyjna).
- ✓ Zastosowanie opracowanych metod (WB-LC-MS/MS, PL-LC-MS/MS i VAMS-LC-MS/MS) w terapeutycznym monitorowaniu stężenia MPA we pełnej krwi, osoczu i krwi włośniczkowej (VAMS) pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki.
- ✓ Walidacja kliniczna uzyskanych wyników oznaczeń poziomu stężeń MPA celem wyznaczenia równania umożliwiającego przeliczenie stężenia MPA w próbkach pobranych metodą VAMS, na przewidywane stężenie MPA w osoczu – zastosowanie metody regresji Passinga-Babloka, oceny błędu metodą Blanda-Altmana, analizy predykcyjnej, analizy korelacyjnej.
- ✓ Walidacja opracowanego modelu predykcyjnego pozwalającego na przeliczenie stężeń MPA_{VAMS} na MPA_{osocze} poprzez porównanie z niezależnym modelem opartym na indywidualnym poziomie hematokrytu i zastosowaniem w niezależnej grupie próbek VAMS i osocza uzyskanych od pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki.

5. MATERIAŁY I METODY

W przeprowadzonych badaniach zastosowano zarówno wzorcowy materiał biologiczny pozbawiony obecności analizowanych związków (uzyskany z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie, jak również materiał diagnostyczny pochodzący od pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki leczonych w Poradni Transplantacji Nerek, IPCZD w Warszawie). Pobranie materiału odbywało się w trakcie rutynowych wizyt kontrolnych, zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej (GLP), po uzyskaniu pisemnej zgody pacjenta i/lub prawnego opiekuna pacjenta (w zależności od wieku). Na wykorzystanie materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów uzyskano zgody Komisji Bioetycznej przy Instytucie-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie nr 17/KBE/2022 oraz nr 36/KBE/2022 (dodatkowo wykorzystano materiał pobrany od pacjentów w ramach badania, na które została wydana zgoda nr 15/KBE/2023).

W próbkach pełnej krwi i krwi włośniczkowej uzyskanej techniką VAMS oznaczono poziom stężenia TAC przed podaniem kolejnej dziennej dawki leku metodą opisaną w publikacji **P₂** (17/KBE/2022). Pełną krew (antykoagulant: wersenian dipotasu; K₂-EDTA) do oznaczeń metodą LC-MS/MS uzyskano w ramach klasycznego protokołu pobrania celem rutynowego oznaczenia C₀ TAC metodą immunochemiczną CMIA w Pracowni Farmakokinetyki IPCZD w Warszawie. Próbki krwi były przechowywane do oznaczeń TAC metodą LC-MS/MS poprzez mrożenie w temperaturze -20°C przez maksymalnie dwa tygodnie. Dodatkowo pobierano próbkę krwi włośniczkowej po nakłuciu palca lancetem za pomocą próbki VAMS (10 µL) i przechowywano po godzinnym suszeniu w temperaturze pokojowej w suchym miejscu bez dostępu światła przez maksymalnie dwa tygodnie, a następnie poddawano procesowi analitycznemu – szczegółowy opis w publikacji **P₂**.

W próbkach pełnej krwi, osoczu i krwi włośniczkowej uzyskanej techniką VAMS oznaczono wartości stężeń MPA przed podaniem kolejnej dziennej dawki leku metodą opisaną w publikacji **P₃** i **komplementarnym suplemencie** do tej pracy (36/KBE/2022 oraz częściowo 15/KBE/2023). Pełną krew i osocze do oznaczeń metodą LC-MS/MS (antykoagulant: K₂-EDTA) uzyskano w ramach klasycznego protokołu pobrania celem oznaczenia C₀ MPA w osoczu metodą chromatograficzną HPLC-DAD w Pracowni Farmakokinetyki IPCZD w Warszawie. Próbki krwi i osocza były zabezpieczane do

oznaczeń MPA metodą LC-MS/MS poprzez mrożenie w temperaturze -20°C przez maksymalnie dwa tygodnie. Dodatkowo pobierano próbkę krwi włośniczkowej po nakłuciu palca lancetem za pomocą próbnika VAMS ($10\ \mu\text{L}$) i przechowywano po godzinnym suszeniu w temperaturze pokojowej w suchym, pozbawionym dostępu światła miejscu przez maksymalnie dwa tygodnie, a następnie poddawano procesowi analitycznemu – szczegółowy opis w publikacji P₃.

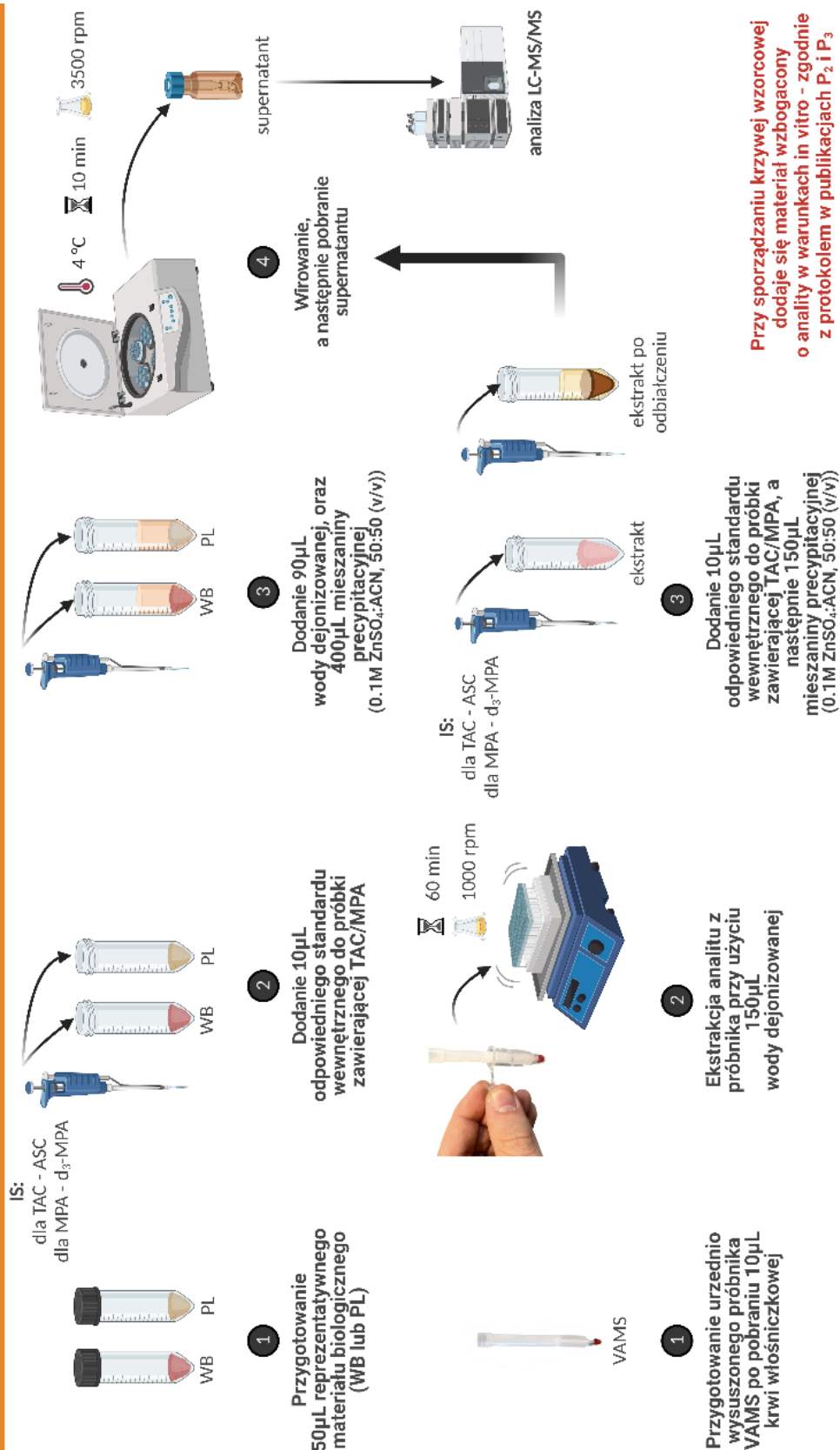
W publikacjach **P₂** i **P₃** opisano szereg zastosowanych metod doświadczalnych, które w końcowym efekcie przełożyły się na uzyskanie pozytywnych wyników walidacji jak i klinicznego zastosowania opisanych metod analitycznych. Metodę przygotowania próbek służących walidacji metod, jak również próbek klinicznych materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów, przedstawiono na ryc. 6. Zastosowane metody doświadczalne to:

- a) **metoda LC-MS/MS** z elektrorozpylaniem w trybie jonizacji dodatniej **ESI(+)** służąca oznaczaniu TAC i MPA, której główne założenia w odniesieniu do poszczególnych analizowanych związków przedstawiono na ryc. 7, oraz odpowiednio w pracach **P₂** i **P₃**,
- b) **metoda immunochemiczna CMIA** (zestaw diagnostyczny Alinity™ ; Abbott, Chicago, IL, USA), którą rutynowo oznacza się poziomy stężenie TAC w Pracowni Farmakokinetyki IPCZD w Warszawie (szczegółowy opis metody zawarto w publikacji **P₂**),
- c) **metoda HPLC-DAD** służąca oznaczeniu poziomu stężeń w osoczu/surowicy krwi, którą rutynowo oznacza się poziomy stężenie TAC w Pracowni Farmakokinetyki IPCZD w Warszawie (szczegółowy opis metody zawarto w publikacji **P₃**),
- d) **metody statystyczne** służące walidacji analitycznej, krzyżowej i klinicznej przeprowadzono przy użyciu oprogramowań Excel 13.65 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), MedCalc 20.11 (MedCalc, Ostend, Belgia), LabSolutions (Shimadzu, Tokio, Japonia) oraz Statistica 12.5 (StatSoft Inc., Kraków). Opis wyznaczanych parametrów walidacyjnych i metod obliczeniowych służących do przeprowadzenia walidacji krzyżowej zgodnie z wytycznymi EMA zostały opisane w częściach eksperymentalnych w pracach **P₂** i **P₃**.

Dodatkowo, metodyka przeprowadzenia walidacji klinicznej została przedstawiona w ramach algorytmu postępowania na ryc. 8.

Szczegółowy opis zastosowanych odczynników chemicznych oraz protokołów laboratoryjnych zamieszczono w pracach **P2**, **P3** i **suplemencie do pracy P3**.

Protokół przygotowania próbek VAMS, WB i PL do oznaczenia TAC i MPA



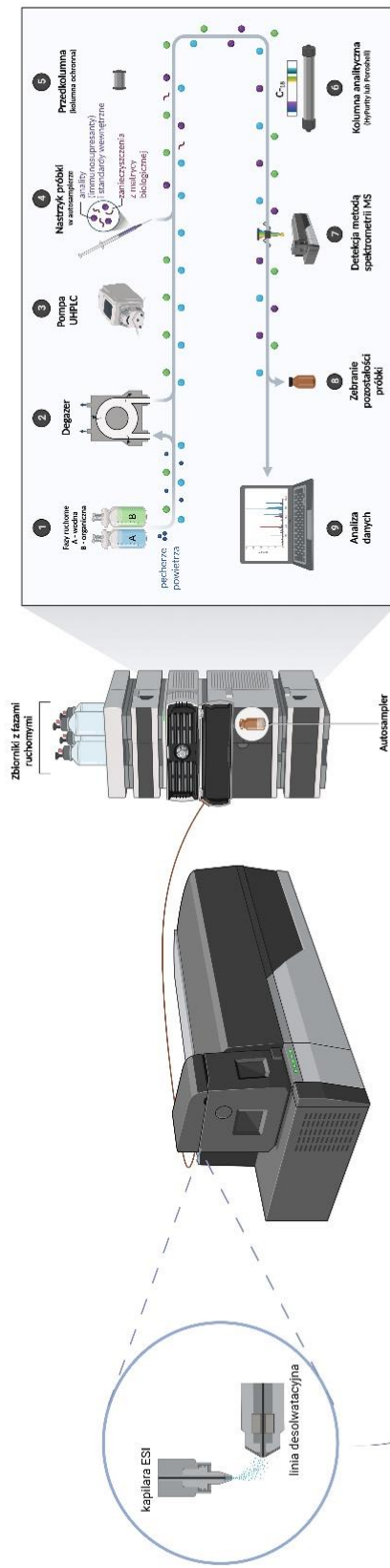
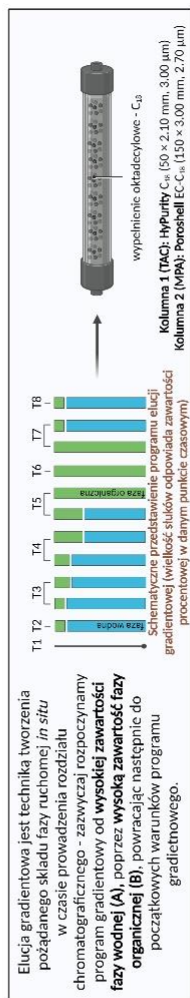
Rycina 6. Metodyka przygotowania próbek pełnej krwi, osocza i VAMS do analizy LC-MS/MS w celu oznaczania TAC i MPA [28,33,36].

Teoretyczne podstawy zwalidowanej metody LC-MS/MS

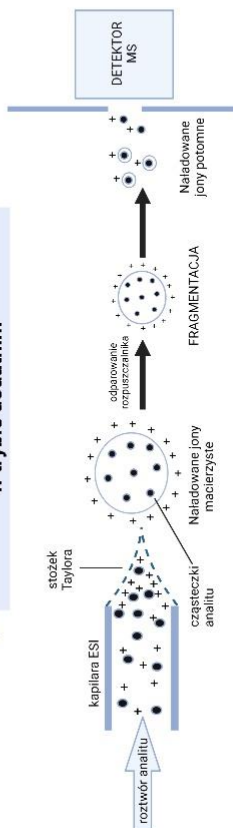
Do oznaczenia zawartości TAC w próbkach krwi żyłnej oraz pobranych metodą VAMS zastosowano technikę LC-MS/MS opartą na askromycynie (lub $^{13}\text{C}_2\text{d}_2$ -TAC) jako standardzie wewnętrznym (IS).

Do oznaczenia zawartości MPA w próbkach krwi żyłnej, osoczku oraz pobranych metodą VAMS zastosowano technikę LC-MS/MS opartą na d_3 -MPA jako standardzie wewnętrznym (IS).

- Zastosowane szybkości przepływu, czas trwania analizy oraz skład faz ruchomych:
- **Metoda oznaczania TAC** (publikacja P₂) - v = 0.75 mL/min; 5 min.
faza wodna (A): woda + dodatek 2mM NH_4F oraz 0.05% HCOOH
faza organiczna (B): ACN/MeOH (50:50) + dodatek 2mM NH_4F oraz 0.05% HCOOH
 - **Metoda oznaczania MPA** (publikacja P₃) - v = 0.50 mL/min; 10 min.
faza wodna (A): woda + dodatek 2mM NH_4F oraz 0.05% HCOOH
faza organiczna (B): MeOH + dodatek 2mM NH_4F oraz 0.05% HCOOH



Elektroizolowanie z jonizacją w trybie dodatnim



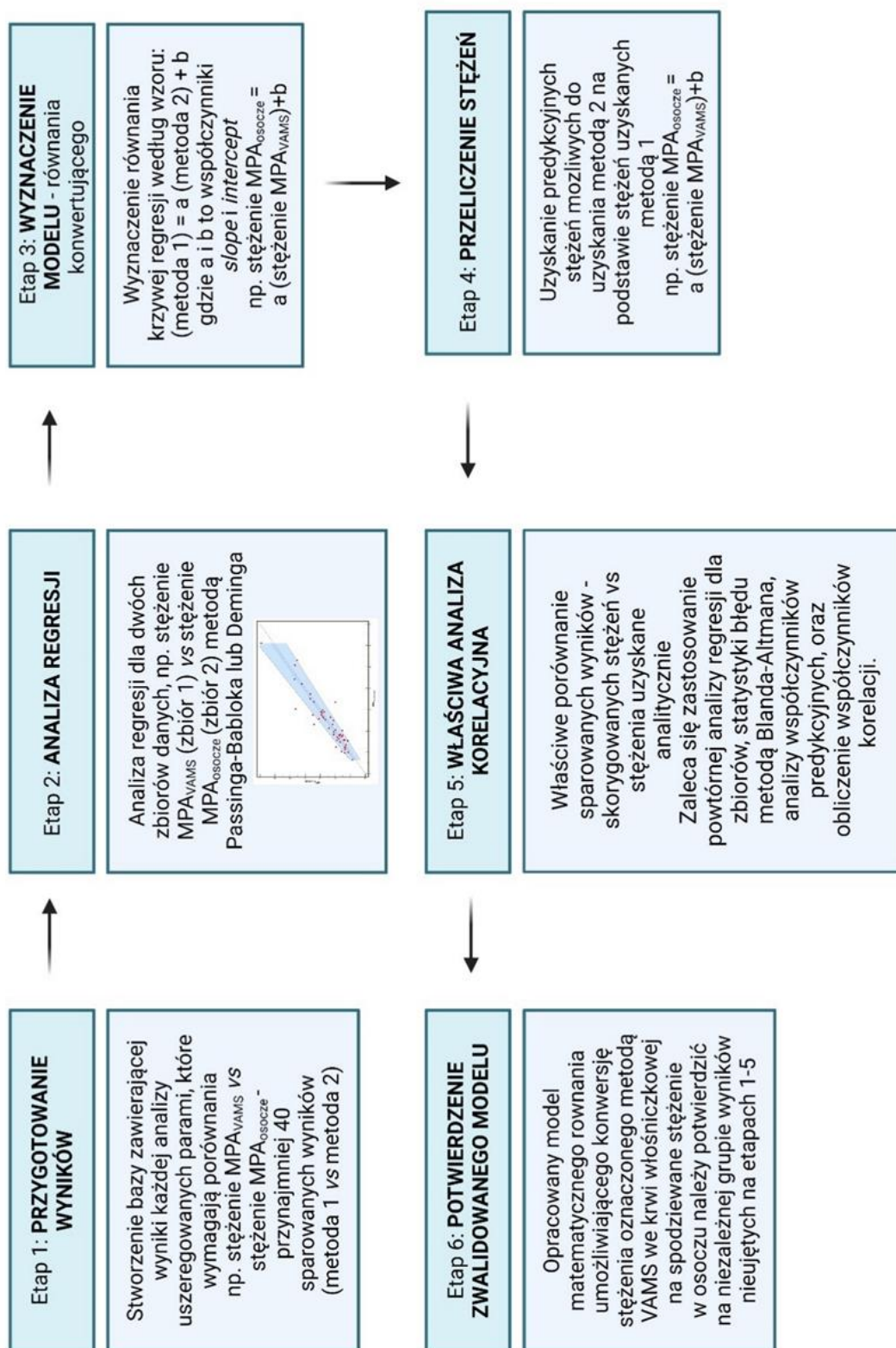
W trakcie detekcji MS zastosowano tryb monitorowania dla następujących par MRM:

- TAC: 821.20 → 768.40 oraz 821.20 → 786.40
- ASC: 824.56 → 771.50 oraz 824.56 → 789.50
- $^{13}\text{C}_2\text{d}_2$ -TAC: 809.20 → 756.55 oraz 809.20 → 564.35
- MPA: 321.10 → 275.00 oraz 321.10 → 285.00
- MPAG: 324.00 → 210.00 oraz 341.00 → 210.00
- d_3 -MPA: 514.21 → 207.04 oraz 514.21 → 303.13

Rycina 7. Teoretyczne omówienie zwalidowanych w ramach niniejszej pracy metod LC-MS/MS oznaczania TAC i MPA – aspekty chromatograficzne i pracy detektora MS [30,33,36].

Pozostałe warunki analizy LC-MS/MS takie jak parametry pracy detektora i szczegóły programów gradientowych podano odpowiednio w pracach doswiadczalnych P₂ i P₃

Walidacja kliniczna metody analitycznej



Rycina 8. Teoretyczne omówienie procesu walidacji klinicznej na przykładzie walidacji metod oznaczania MPA [32,34-36].

6. UZYSKANE WYNIKI I DYSKUSJA

Na niniejsze badania naukowe będące postawą do uzyskania tytułu doktora składają się dwie prace oryginalne (doświadczalne – **P₂**, **P₃**) oraz praca przeglądowa będąca wstępem teoretycznym do pojęcia tematu rozprawy – **P₁**). Poniżej przedstawiono krótkie opisy uzyskanych wyników oraz ich konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Pełne przedruki prac włączonych w niniejszy cykl zostały przedstawione na str. 64 - 158, gdzie można znaleźć pełne odniesienie do uzyskanych wyników i ich dyskusję.

6.1 ETAPI (Publikacja **P₁**)

Kocur A, Pawiński T. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):681. <https://doi.org/10.3390/ijms24010681>

W pracy opisano technikę VAMS, jak również dokonano przeglądu literaturowego metod analitycznych, które zostały opracowane w celu oznaczania leków immunosupresyjnych w próbkach pobranych techniką VAMS. Dodatkowo, porównano technikę VAMS z innymi metodami polegającymi na uzyskiwaniu próbek krwi o niewielkiej objętości (<100µl), jak również scharakteryzowano potencjał aplikacyjny opisywanej metody, oraz wskazano najważniejsze punkty krytyczne, na które należy zwrócić uwagę w fazie przedanalitycznej, analitycznej oraz klinicznej. W momencie opublikowania, była to pierwsza praca kompleksowo opisująca zastosowanie techniki VAMS w terapii immunosupresyjnej. Po raz pierwszy wskazano na błędy, które można popełnić w trakcie pobierania próbek, przechowywania, przygotowania do oznaczenia określoną metodą analityczną, jak również wskazano propozycje rozwiązania opisanych problemów. Zwrócono również uwagę na potrzebę powstania programu zewnętrznej oceny biegłości laboratoriów ukierunkowanego na technikę VAMS, który jak dotąd nie został stworzony komercyjnie [28,37,38].

Uzyskane wnioski w trakcie przeglądu literaturowego w publikacji **P₁** przyczyniły się do zaplanowania prac doświadczalnych, które zostały opisane w publikacjach **P₂** i **P₃**. Dzięki temu, można było uniknąć wielu błędów zarówno na etapie doświadczalnym, jak i w trakcie walidacji analitycznej, krzyżowej i klinicznej. Dodatkowo, praca może stanowić swoisty poradnik i punkt wyjścia do prowadzenia prac eksperymentalnych nad

stosowaniem techniki VAMS w monitorowaniu innych leków, czy parametrów biochemicznych.

6.2 ETAP II (Publikacja P₂)

Kocur A, Marszałek D, Rubik J, Czajkowska A, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*. 2023; 15(1):299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>

W pracy opisano protokół walidacyjny metody oznaczania TAC metodą LC-MS/MS w krwi żyłnej i próbkach pobranych techniką VAMS. Dodatkowo, dokonano ewaluacji metody w zakresie walidacji krzyżowej pomiędzy opisanymi metodami, jak również z rutynowo stosowaną techniką immunochemiczną CMIA. Opracowany protokół analityczny został z powodzeniem zastosowany do oznaczenia stężenia C₀ w próbkach uzyskanych od pediatrycznych biorców nerki [n=50].

W trakcie opracowania metody analitycznej służącej oznaczeniu TAC w pełnej krwi, zastosowano dwa standardy wewnętrzne- ASC (analog strukturalny TAC), oraz ¹³C,₂-TAC (znakowany izotopowo stabilny standard wewnętrzny, ang. *stable isotoped labelled internal standard*; SIL-IS). Walidację przeprowadzono w zakresie kalibracji 0-60 ng/ml zgodnie z wytycznymi EMA [32]. Lepsze parametry walidacyjne metody uzyskano stosując ASC, w związku z czym to ta substancja została użyta jako IS do optymalizacji i walidacji metody oznaczania TAC w próbkach VAMS. Dodatkowo, przez ograniczoną czystość standardu izotopowego TAC, na chromatogramach pojawiał się dodatkowy pik odpowiadający zanieczyszczeniom. W obydwu metodach (oznaczonych: WB-LC-MS/MS dla oznaczeń TAC w pełnej krwi żyłnej oraz VAMS-LC-MS/MS dla oznaczeń TAC w próbkach VAMS) zastosowano fazę ruchomą z dodatkiem fluorku amonu, przez co uzyskano niższą granicę oznaczalności (ang. *limit of detection*, LOD), aniżeli przy użyciu organicznych soli amonowych. W celu zminimalizowania efektów matrycowych, próbkę oczyszczono przez odbiałczanie mieszaniną 0.1 mol/l siarczanu cynku i 100% acetonitrylu (50:50, v/v). W przypadku metody opartej na VAMS, zastosowano stosunkowo krótki czas suszenia próbника po pobraniu, jak również zastosowano wodę jako odczynnik ekstrakcyjny, przez co uzyskano najkrótszy jak dotąd

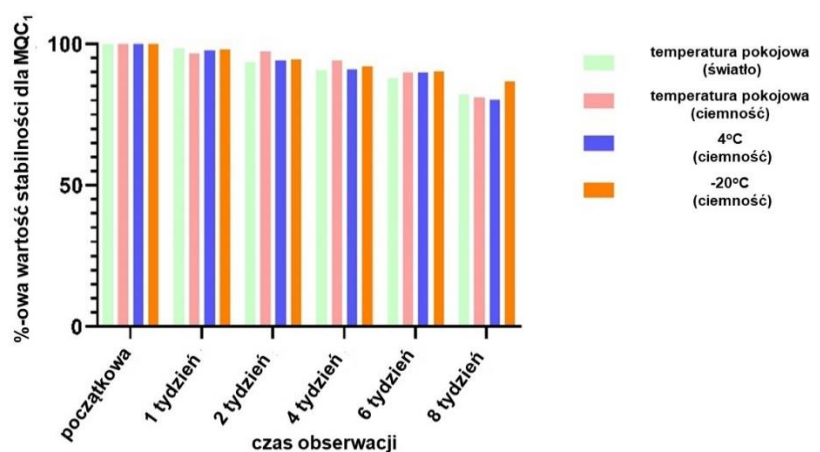
czas trwania procesu licząc od momentu pobrania próbki do momentu uzyskania wyniku analitycznego. Skrócenie czasu nie spowodowało istotnych różnic w odzysku analitu z próbki VAMS, co zostało potwierdzone doświadczalnie w pracy **P₂** (nieopublikowane wyniki). W trakcie analizy LC-MS/MS zastosowano gradientowy przepływ fazy ruchomej, przez co uzyskano zadowalający czas retencji analitów (zarówno TAC, jak i obydwie IS) równy 1,50 min. W przypadku obydwu protokołów analitycznych wykorzystujących ASC jako IS, nie odnotowano efektu przeniesienia (ang. *carry-over*) ani efektu matrycy (ang. *matrix effect*, ME) oznaczanego według metodyki Taylora i in. oraz Zhou i in. [39,40].

Nie zaobserwowano efektu hematokrytowego (HE) – wykazano brak istotnej korelacji pomiędzy różnicami w poziomach stężeń oznaczonych w próbce pełnej krwi i VAMS, a poziomem hematokrytu w osobniczym przypadku dla pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki. Przeprowadzono dodatkowo eksperyment powtarzalności analizy próbek dla 20% całkowitej liczby oznaczonych próbek pacjentów (ang. *incurred sample reanalysis results*; ISR) w dwukrotnym powtórzeniu – w żadnym przypadku nie zauważono odchylenia od kryteriów akceptacji sformułowanych przez EMA (średnia różnica pomiędzy pomiarami stężeń <20% dla 67% analizowanych próbek) [32,41].

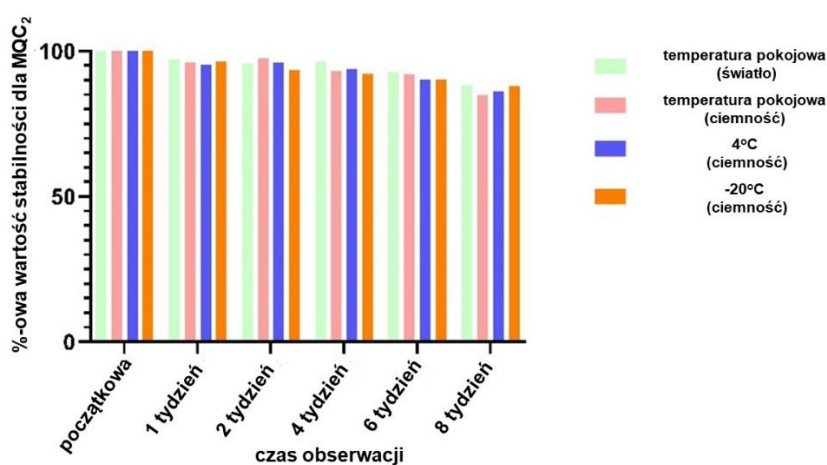
Przeprowadzona walidacja krzyżowa dowiodła o możliwości wymiennego stosowania zwalidowanych metod (WB-LC-MS/MS *versus* VAMS-LC-MS/MS) na podstawie analiz korelacyjnych, regresji Passinga-Babloka oraz oceny różnic błędów metodą Blanda-Altmana. Szczegółowe wyniki tych analiz zamieszczone są w sekcji 3.6 publikacji **P₂**. Stwierdzono również możliwość wymiennego stosowania metody VAMS i CMIA, z systematycznym błędem dotyczącym różnic pomiędzy wartościami stężeń TAC uzyskanych obiema metodami na poziomie -11,91%, a wyznaczony algorytm - równanie regresji umożliwia przeliczenie stężenia TAC w VAMS, na estymowane stężenie tego leku, możliwe do uzyskania metodą CMIA.

Zwalidowane metody zostały użyte do oznaczenia stężeń TAC w próbkach pełnej krwi oraz VAMS uzyskując następujące średnie stężenia leku wyrażone w ng/ml: $7,44 \pm 3,58$ (3,70–26,71) oraz $7,33 \pm 3,84$ (3,10–28,13) – odpowiednio dla WB-LC-MS/MS oraz VAMS-LC-MS/MS (podane jako średnia \pm odchylenie standardowe, oraz przedział uzyskanych wyników). W przypadku rutynowo stosowanej metody CMIA, w laboratorium farmakokinetycznym uzyskano następujące średnie wyniki oznaczeń wyrażone w ng/ml: $8,12 \pm 3,61$ (4,12 – 26,30).

W opisie pracy wskazano również na ograniczenia przeprowadzonego badania, które mogą być uznane za jego słabszą stronę. Po pierwsze, przeprowadzona walidacja kliniczna obejmowała tylko jeden ośrodek, przez co uzyskane wyniki nie mogą być ekstrapolowane bezpośrednio na całą populację pediatryczną przyjmującą TAC. Nie oceniano procesu samodzielnego pobierania próbek przez pacjentów/rodziców w szpitalu, ani w domu. W publikacji nie zawarto informacji na temat stabilności analitu w próbnikach VAMS i wpływu na jego odzysk, jednak parametr ten został zbadany w późniejszym czasie (ryc. 9, dane niepublikowane). Zauważono, że analit był stabilny w trakcie 8-tygodniowej obserwacji dla użytych stężeń kalibratorów MQC₁ i MQC₂ (średnia kontrola kalibracyjna 1 i 2, odpowiednio stężenia TAC: 7,5 ng/ml i 25 ng/ml), we wszystkich testowanych warunkach (w temperaturze pokojowej z dostępem światła i bez dostępu światła, w 4°C i -20°C bez dostępu światła). Uzyskane wyniki stabilności są zbieżne z pracami Kostera i in. oraz Paniagui i in [42,43].



(A)



(B)

Rycina 9. Wykresy przedstawiające badanie stabilności TAC w próbnikach VAMS dla dwóch poziomów kalibracyjnych (wykres A – MQC₁, 7,5 ng/ml i wykres B- MQC 25 ng/ml) w różnych warunkach (interpretacja w tekście, oznaczenia w legendzie wykresów).

6.3 ETAP III (Publikacja P₃)

Kocur A, Rubik J, Czarnowski P, Czajkowska A, Marszałek D, Sierakowski M, Górka M, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly With Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, And Clinical Application. *Pharmacological Reports*. 2023; *Publication accepted – ahead of print*. <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00509-w>.

W pracy P₃ (ostatnim etapie niniejszej pracy doktorskiej) opisano protokół walidacyjny metody oznaczania MPA metodą LC-MS/MS w krwi żyłnej, osoczu i próbkach pobranych techniką VAMS. Dodatkowo, opisano protokół analityczny dotyczący rutynowo stosowanej metody HPLC-DAD służącej oznaczaniu stężeń MPA w osoczu lub surowicy pacjentów leczonych w IPCZD w Warszawie. Opracowane metody zostały wykorzystane z powodzeniem w oznaczeniu stężenia C₀ w próbkach materiału biologicznego pobranego od pacjentów po przeszczepieniu nerki. Ze względu na fakt, iż osocze lub surowica jest rekomendowaną matrycą biologiczną służącą oznaczeniu MPA (wysoki poziom dystrybucji leku w tej frakcji krwi), a metoda VAMS pozwala na pobranie krwi włośniczkowej, dokonano pełnej walidacji krzyżowej i klinicznej służącej otrzymaniu współczynnika przeliczeniowego pomiędzy stężeniem MPA w krwi a stężeniem w osoczu [13,31]. **Walidacja została potwierdzona na niezależnych próbkach pochodzących od pacjentów nieujętych w procesie walidacji klinicznej.**

Opracowany protokół przygotowania próbek do analizy był oparty na wcześniej przeprowadzonych eksperymentach dotyczących TAC, zarówno w odniesieniu do czasu suszenia próbki VAMS jak i procesu oczyszczenia próbki w procedurze odbiałczania (P₂). Przeprowadzono pełną walidację zgodną z wytycznymi EMA w zakresie kalibracji 0-15 µg/ml, stosując d₃-MPA jako SIL-IS [28]. Dokonano pełnej optymalizacji procesu detekcji masowej, poprzez monitorowanie MPAG, który w przypadku zbyt wysokich wartości temperatur procesu desolwatacji w źródle jonów powodował zwiększenie wysokości piku MPA, poprzez uwolnienie wolnego MPA z MPAG w źródle jonów w procesie fragmentacji. Ustalone doświadczalnie warunki pracy detektora przedstawiono w publikacji P₃.

W trakcie analizy LC-MS/MS zastosowano gradientowy przepływ fazy ruchomej, przez co uzyskano zadowalający czas retencji analitów (zarówno dla MPA i IS, jak i MPAG) równy odpowiednio: 5,58 i 5,20 min. W przypadku zastosowanych protokołów

analitycznych z oznaczeniami przeprowadzonymi w trzech matrycach (WB, PL, VAMS) nie zauważono efektu przeniesienia (ang. *carry-over*) ani ME, obliczonego identycznie jak w przypadku TAC (**P₂**) [39,40].

Nie zaobserwowano HE - nie stwierdzono istotnej korelacji między różnicami w poziomach stężeń MPA mierzonych w próbkach krwi pełnej i VAMS u pacjentów pediatrycznych po przeszczepie nerki a poziomami hematokrytu w poszczególnych przypadkach. Dodatkowo eksperymenty ponownej analizy próbek przeprowadzono dla 10% całkowitej liczby oznaczonych próbek pacjentów- w żadnym przypadku nie zaobserwowano odchyżeń od kryteriów akceptacji ustalonych przez EMA (średnie różnice w pomiarach stężeń mniejsze niż 20% dla 67% analizowanych próbek) [32].

Zauważono, że analit był stabilny w trakcie 6-tygodniowej obserwacji dla użytych stężeń kalibratorów LQC i HQC (najniższa i najwyższa kontrola kalibracyjna, odpowiednio stężenia MPA: 0,35 ng/ml i 12,50 ng/ml), podczas przechowywania w temperaturze pokojowej z dostępem światła i bez dostępu światła oraz w 4°C bez dostępu światła). Podczas przechowywania w -20°C bez dostępu światła, MPA był stabilny przez cały czas trwania obserwacji, tj. 8 tygodni. Uzyskane wyniki są zbieżne z pracami Kostera i in. oraz Paniagui i in [42, 43]. Pełne wyniki walidacji metody i badań stabilności zawarte są w publikacji **P₃** i komplementarnym suplemencie.

Przeprowadzona walidacja krzyżowa dowiodła o możliwości wymiennego stosowania zwalidowanych metod (WB-LC-MS/MS versus VAMS-LC-MS/MS oraz HPLC-DAD versus PL-LC-MS/MS) na podstawie analiz korelacyjnych, regresji Passinga-Babloka oraz oceny różnic błędów metodą Blanda-Altmana. Szczegółowe wyniki tych analiz, wraz z kryteriami akceptacji zamieszczone są w publikacji **P₃**. Nie potwierdzono jednak równoważności metod oznaczania stężenia MPA w osoczu i próbkach pobranych metodą VAMS. Z tego powodu, analizę regresji Passinga-Babloka wykorzystano do przeliczenia stężenia MPA oznaczonego w próbkach VAMS, na stężenie przewidywane w osoczu krwi. Dodatkowo, zastosowano drugą metodę przeliczenia stężeń MPA wykorzystującą indywidualny dla każdego pacjencie poziom HT. Wyniki konwersji stężenia MPA oznaczonego w próbkach VAMS przy użyciu obydwu modeli (odpowiednio regresji i opartego na HT) porównano poddając je powtórnej analizie opisanej na wspomnianych wcześniej schemacie (ryc. 8). Szczegółowe wyniki wraz z kryteriami akceptacji zawarte są w publikacji **P₂** (tabela 2 i paragraf 9.4). Należy zaznaczyć, iż opisany w niniejszej pracy model regresji jest pierwszym według mojej wiedzy opublikowanym równaniem, spełniającym kryteria EMA i IATDM&CT, zwalidowanym na niezależnej

grupie pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki. Opracowany współczynnik korygujący posłużył konwersji stężenia MPA oznaczonego w VAMS na przewidywane stężenie w MPA osoczu [29]. Dodatkowo wyznaczone współczynniki analizy predykcji (praca P₃) potwierdziły dokładność obliczeń dokonywanych za pomocą tego modelu.

Zwalidowane metody zostały użyte do oznaczenia stężeń MPA w próbkach pełnej krwi, osoczu oraz VAMS uzyskując następujące średnie stężenia leku wyrażone w µg/ml: $1,39 \pm 0,84$ (0,26 – 4,60), $2,47 \pm 1,20$ (0,86 – 6,92) oraz $1,43 \pm 0,77$ (0,41 – 4,14) – odpowiednio dla WB-LC-MS/MS, PL-LC-MS/MS oraz VAMS-LC-MS/MS (podane jako średnia ± odchylenie standardowe, oraz przedział uzyskanych wyników). Wyniki oznaczeń stężenia MPA w próbkach VAMS zostały poddane konwersji na spodziewane stężenia w osoczu, przy użyciu równania regresji ($C_{MPA(\text{osocze})} = 1,60 \cdot C_{MPA(\text{VAMS})} + 0,08$), oraz równania opartego na poziomie HT ($C_{MPA(\text{osocze})} = C_{MPA(\text{VAMS})} / 1 - HT$). Uzyskano następujące, przewidywane stężenia MPA w osoczu, wyrażone w µg/ml, odpowiednio: $2,37 \pm 1,26$ (0,74 – 6,72) oraz $2,26 \pm 1,23$ (0,61 – 6,55). W przypadku rutynowo stosowanej metody HPLC-DAD, uzyskano następujące średnie wyniki oznaczeń wyrażone w µg/ml: $2,38 \pm 1,16$ (0,64 – 6,18). Odpowiednio niższe wyniki oznaczeń stężeń MPA uzyskano we krwi i próbkach pobranych metodą VAMS, ze względu na oczywiste rozcieńczenie MPA w próbce i zawartość osocza w pełnej krwi (ok. 55-60% całkowitej objętości krwi).

W opisie pracy wskazano również na ograniczenie związane z jednorazowym pobieraniem próbek (wykonano tylko pobranie przed podaniem kolejnej dawki leku), oraz na słabe strony badania opisane również w poprzednich pracach, a mianowicie: brakiem systemu zewnętrznej oceny laboratoryjnej oraz zastosowaniem opracowanych metod tylko w populacji pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki [38].

7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy, możliwe jest sformułowanie następujących wniosków, które są zbieżne z konkluzjami opisanymi w pracach włączonych do cyklu rozprawy doktorskiej:

1. Opracowano metody LC-MS/MS pozwalające na stosunkowo szybkie, proste i czułe oznaczenie poziomów stężeń TAC (zakres kalibracji 0-60 ng/ml; pełna krew oraz mikropróbki VAMS) oraz MPA (zakres kalibracji 0-15 µg/ml; pełna krew, osocze oraz mikropróbki VAMS). Uzyskane parametry walidacyjne spełniają kryteria akceptacji EMA i IATDM&CT.
2. Wykazano, że redukcja czasu suszenia próbника VAMS do 1 godziny, połączona z ekstrakcją przy użyciu prostego rozpuszczalnika nieorganicznego, jakim jest woda, pozwala na zadowalające i dokładne oznaczenie TAC i MPA w mikropróbkach krwi włośniczkowej.
3. Zarówno dla TAC jak i MPA wykazano brak wpływu efektu hematokrytu na odzysk analitu z próbek pobranych metodą VAMS poprzez porównanie uzyskanych poziomów stężeń z metodą referencyjną LC-MS/MS (odpowiednio w pełnej krwi dla TAC i osoczu dla MPA).
4. Wykazano, że w przypadku oznaczenia ilościowego TAC w próbkach pełnej krwi metodą LC-MS/MS, zastosowanie askomycyny jako IS, okazało się lepszym wyborem, szczególnie w odniesieniu do kompensacji efektów matrycowych i jakości uzyskanych wyników. Brak efektu matrycy zaobserwowano również w przypadku oznaczeń MPA metodą LC-MS/MS przy zastosowaniu znakowanego izotopowo standardu wewnętrznego – MPA-d₃.
5. Wykazano zadowalającą stabilność MPA w próbnikach VAMS przechowywanych przez 6 tygodni zarówno w temperaturze pokojowej (na świetle i w ciemności) jak i w lodówce (4°C), oraz przynajmniej 8-tygodniową stabilność podczas przechowywania w -20°C, podczas gdy TAC był stabilny w opisywanych warunkach przez cały czas trwania obserwacji.
6. Udowodniono równoważność metod analitycznych służących pomiarowi stężenia TAC, co umożliwia przyjęcie takich samych referencyjnych przedziałów stężeń terapeutycznych, traktując jednocześnie metody jako wymienne w praktyce klinicznej. Jakkolwiek udowodniono wysoką korelację krzyżową pomiędzy metodą

immunochemiczną CMIA a metodą VAMS LC-MS/MS, należy brać pod uwagę ewentualne interferencje krzyżowe z metabolitami TAC, które powodują wyraźne zawyżenie stężenia tego leku.

7. Wykazana podczas walidacji krzyżowej stosunkowo wysoka korelacja pomiędzy stężeniami MPA oznaczonymi metodą LC-MS/MS: w pełnej krwi w porównaniu z próbkami pobranymi metodą VAMS dowiodła, że stężenie leku w próbkach krwi kapilarnej odpowiada jego zawartości ogólnoustrojowej. Świadczy to również o wysokim współczynniku odzysku analitu podczas ekstrakcji z chłonnego polimeru próbnika VAMS.
8. Podczas walidacji klinicznej opracowano model pozwalający na oszacowanie stężenia MPA w osoczu (referencyjnie stosowana matryca biologiczna w oznaczeniach tego analitu) na podstawie stężenia MPA w krwi włośniczkowej pobranej metodą VAMS. Wyznaczono równanie korygujące: $C_{MPA(\text{osocze})} = 1,60 \cdot C_{MPA(\text{VAMS})} + 0,08$, które zostało odpowiednio zwalidowane w oparciu o metody statystyczne, jak również potwierdzone na niezależnej grupie pacjentów. Należy zaznaczyć, że udowodniono możliwość użycia tej formuły korygującej wymiennie z powszechnie stosowanym algorytmem opartym na indywidualnym poziomie hematokrytu. Dodatkowo, jest to pierwszy, jak dotąd opublikowany model służący korygowaniu stężenia MPA w próbkach VAMS, spełniający kryteria akceptacji IATDM&CT dotyczące walidacji klinicznej.
9. **Zgodnie z najlepszą wiedzą, przedstawione prace badawcze (P₂ i P₃) są pierwszym opracowaniem obejmującym pełną walidację analityczną, krzyżową i kliniczną metod LC-MS/MS bezpośrednio w populacji pediatrycznej po przeszczepieniu nerki.**
10. Metoda VAMS jest technika wymagająca szeregu modyfikacji do ostatecznego, rutynowego zastosowania w praktyce klinicznej, jednakże ze względu na ograniczoną inwazyjność w stosunku do pacjenta, może prowadzić do poprawy stopnia przestrzegania zaleceń terapeutycznych w grupie pacjentów pediatrycznych. Dodatkowo może pozwolić na lepszą optymalizację terapii immunosupresyjnej, redukcję kosztów opieki zdrowotnej, jak również rozwój pewnych elementów telemedycyny. Ograniczony dostęp do opieki zdrowotnej w trakcie pandemii SARS-CoV-2, jak również fakt iż jedynym ośrodkiem transplantacyjnym dla dzieci w Polsce jest IPCZD w Warszawie, przemawia na

korzystać VAMS jako alternatywnego sposobu monitorowania terapii immunosupresyjnej.

8. PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Podsumowując, techniki mikropróbkiowania są atrakcyjną formą alternatywnego pobierania próbek materiału biologicznego. Możliwe jest pobranie nie tylko krwi, ale również śliny, moczu, łez, potu, mleka matki, czy płynu mózgowo-rdzeniowego. Dużą nadzieję wiąże się z technikami pozwalającymi na otrzymanie osocza *in situ* w narzędziu do mikropróbkiowania, bezpośrednio z pobranej próbki krwi włośniczkowej, co pozwoli na przygotowanie próbki z użyciem rekomendowanej matrycy biologicznej, bez konieczności wprowadzania algorytmu przeliczeniowego. Cena jednostkowa pojedynczego próbnika Mitra™ jest wyższa niż cena karty DBS lub zestawu do pobrania krwi żyłnej. Z drugiej strony, mikropróbkiowanie ma więcej zalet i korzyści dla obniżenia kosztów dożywotniej farmakoterapii, może uprościć przeprowadzanie badań klinicznych, czy prowadzenie bardziej humanitarnych eksperymentów na zwierzętach w oparciu o zasadę 3R w toksykologii alternatywnej – ograniczyć, udoskonalić, zastąpić (ang. *reduce, refine, replace*) [23,28].

Zgodnie z zaleceniami producenta, pobieranie próbek krwi może być wykonywane w dowolnym czasie, miejscu i przez niemal każdego. Uważa się więc, że urządzenia do mikropróbkiowania objętościowo (VAMS) stanowią szansę na poprawę jakości terapii immunosupresyjnej [22,23,26].

Badania sugerują, że C_0 dla TAC, a AUC_{0-12} dla MPA są właściwymi parametrami farmakokinetycznymi służącymi optymalizacji terapii immunosupresyjnej w praktyce klinicznej, zarówno w populacji dorosłych, jak i dzieci [9,11,13]. Dzięki zastosowaniu techniki VAMS, wykonanie całkowitych profili farmakokinetycznych może stać się rutynowo stosowaną procedurą medyczną przeprowadzaną poza placówką służby zdrowia, samodzielnie przez pacjenta. Dodatkowo, urządzenia tego typu mogą pozwolić na przewlekłe monitorowanie funkcji przeszczepionego narządu, np. stężenia kreatyniny, czy innych biomarkerów odzwierciedlających pracę nerek – takie badania stanowiłyby kontynuację podjętego tematu rozprawy doktorskiej.

Pilotażowe wdrożenie techniki mikropróbkiowania do praktyki klinicznej powinno znacząco poprawić przestrzeganie zaleceń lekarskich przez pacjentów pediatrycznych. Istnieje ograniczona liczba tego typu badań i według najlepszej wiedzy jest to pierwsze opublikowane badanie naukowe dotyczące techniki VAMS użytej podczas pobierania krwi u pacjentów po przeszczepieniach narządowych w Polsce. Wydaje się, że wyniki mogą

udoskonalić terapię spersonalizowaną i być może zapoczątkować tego typu badania w innych grupach leków, w przypadku których konieczne jest TML.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Papalois V, Najarian JS. Pediatric kidney transplantation: Historic hallmarks and a personal perspective. *Pediatric Transplantation*. **2001**;5(4):239–45.
2. Josephson MA, Becker Y, Budde K, Kasiske BL, Kiberd B, Loupy A, et al. Challenges in the Management of the Kidney Allograft: From Decline to Failure: Conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International*. **2023** (article in press).
3. Oomen L, Bootsma-Robroeks CMHHT, Cornelissen EAM, De Wall LLL, Feitz WFJ. Pearls and Pitfalls in Pediatric Kidney Transplantation After 5 Decades. *Frontiers in Pediatrics*. **2022**;8;10.
4. Czerwiński J, Antoszkiewicz K, Woderska-Jasińska A, Danek T, M H, Łęczycka A, et al. The Current Status of Organ Donation and Transplantation in Poland. Poltransplant Activity. *Transplantation Proceedings*. **2022**;54(4):837–47.
5. Singer P. Post-transplant education for kidney recipients and their caregivers. *Pediatric Nephrology*. **2022**;38(7):2033–42.
6. Kindem IA, Bjerre A, Hammarström C, Naper C, Midtvedt K, Åsberg A. Kidney-transplanted Adolescents—Nonadherence and Graft Outcomes During the Transition Phase: A Nationwide Analysis, 2000–2020. *Transplantation*. **2023**;107(5):1206–12.
7. Pape L. State-of-the-art immunosuppression protocols for pediatric renal transplant recipients. *Pediatric Nephrology*. **2017**;34(2):187–94.
8. Tönshoff B. Immunosuppressants in Organ Transplantation. In: Handbook of experimental pharmacology. *Springer Science*. **2019**; 441–69.
9. Brunet M, Van Gelder T, Åsberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman LJ, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus—Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2019**;41(3):261–307.
10. Kocur A, Kunicki PK, Pawinski T. Generic Medicinal Products in Immunosuppressive Therapy—Should It be a Challenge for Therapeutic Drug Monitoring? *Therapeutic Drug Monitoring*. **2023**;45(2):173–90.
11. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clinical Therapeutics*. **2002**; 24(3):330–50.
12. Grenda R, Watson AT, Trompeter RS, Tönshoff B, Járay J, Fitzpatrick ME, et al. A Randomized Trial to Assess the Impact of Early Steroid Withdrawal on Growth in Pediatric Renal Transplantation: The TWIST Study. *American Journal of Transplantation*. **2010**;10(4):828–36.

13. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, et al. Personalized Therapy for Mycophenolate: Consensus Report by the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2021**;43(2):150–200.
14. Hocker B, Van Gelder T, Martin-Govantes J, Machado P, Tedesco H, Rubik J, et al. Comparison of MMF efficacy and safety in paediatric vs. adult renal transplantation: subgroup analysis of the randomised, multicentre FDCC trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **2010**;26(3):1073–9.
15. Dasgupta A. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid. In: Advances in Clinical Chemistry. Elsevier BV. **2016**;165–84.
16. Rianthavorn P, Ettenger RB, Mh M, Marik J, Struber M. Noncompliance with immunosuppressive medications in pediatric and adolescent patients receiving solid-organ transplants. *Transplantation*. **2004**;77(5):778–82.
17. Dobbels F, Ruppert TM, De Geest S, Decorte A, Van Damme-Lombaerts R, Fine RN. Adherence to the immunosuppressive regimen in pediatric kidney transplant recipients: A systematic review. *Pediatric Transplantation*. **2009**;14(5):603–13.
18. Vrijens B, De Geest S, Hughes DA, Przemyslaw K, Demonceau J, Ruppert TM, et al. A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2012**;73(5):691–705.
19. Hezer B, Massey EK, Reinders MEJ, Tielen M, Van De Wetering J, Hesselink DA, et al. Telemedicine for Kidney Transplant Recipients: Current State, Advantages, and Barriers. *Transplantation*. **2023**;publish ahead of print.
20. Gokoel SRM, Gombert-Handoko KB, Zwart T, Van Der Boog PJM, Moes DJAR, De Fijter JW. Medication non-adherence after kidney transplantation: A critical appraisal and systematic review. *Transplantation Reviews*. **2020**;34(1):100511.
21. Protti M, Mandrioli R, Mercolini L. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Analytica Chimica Acta*. **2019**;1046:32–47.
22. Delahaye L, Veenhof H, Koch BCP, Alffenaar JC, Linden R, Stove C. Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples: State-of-the-Art. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2021**;43(3):310–321.
23. Londhe V, Rajadhyaksha M. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2020**;182:113102.
24. Capiou S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* **2019**;41(4):409–30.
25. Capiou S, Stove CP. Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2020**;190:113491.

26. Mitra Resources | User Guides, Applications and How to Guides. Neoteryx website [dostęp 7 lipca 2023]. <https://www.neoteryx.com/mitra-vams-resources>
27. Denniff P, Spooner N. Volumetric Absorptive Microsampling: A Dried Sample Collection Technique for Quantitative Bioanalysis. *Analytical Chemistry* **2014**;86(16):8489–95.
28. Kocur A, Pawinski T. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. **2022**;24(1):681.
29. Leino AD, Takyi-Williams J, Pai MP. Volumetric Absorptive Microsampling to Enhance the Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus and Mycophenolic Acid: A Systematic Review and Critical Assessment. *Therapeutic Drug Monitoring* **2023**; *publish ahead of print*.
30. McShane AJ, Bunch DR, Wang S. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants by liquid chromatography–mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. **2016**;454:1–5.
31. Seger C, Shipkova M, Christians U, Billaud EM, Wang P, Holt DW, et al. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2016**;38(2):170–89.
32. EMA. ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline European Medicines Agency European Medicines Agency. 2023. . [dostęp 7 lipca 2023]. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
33. Kocur A, Rubik J, Czarnowski P, Czajkowska A, Marszałek D, Sierakowski M, Górka M, Pawinski T. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly With Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, And Clinical Application. *Pharmacological Reports*. **2023**; *publish ahead of print*.
34. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*. **2011**;49–52.
35. Wu G. Calculating predictive performance: A user’s note. *Pharmacological Research*. **1995**;1
36. Kocur A, Marszałek D, Rubik J, Czajkowska A, Pawinski T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*. **2023**;15(1):299.

37. Christians U, Vinks AA, Langman LJ, Clarke W, Wallemacq P, Van Gelder T, et al. Impact of Laboratory Practices on Interlaboratory Variability in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2015**;37(6):718–24.
38. Veenhof H, Koster RA, Junier L a T, Zweipfenning PGM, Holst JJ. Results From a Proficiency Testing Pilot for Immunosuppressant Microsampling Assays. *Therapeutic Drug Monitoring*. **2022** Aug 13;45(1):61–8.
39. Zhou W, Yang S, Wang PG. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. **2017**;9(23):1839–44.
40. Taylor PD. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* **2005**;38(4):328–34.
41. Kocur A. Incurred samples reanalysis experiment for tacrolimus determination in VAMS and whole blood samples obtained from pediatric patients after renal transplantation. *Figshare dataset*. **2023**. [dostęp 7 lipca 2023]. https://figshare.com/articles/dataset/Incurred_samples_reanalysis_experiment_for_tacrolimus_determination_in_VAMS_and_whole_blood_samples_obtained_from_pediatric_patients_after_renal_transplantation_/21829779
42. Paniagua-González L, Díaz-Louzao C, Lendoiro E, Otero-Antón E, Cadarso-Suárez C, López-Rivadulla M, et al. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by LC–MS/MS using a novel atmospheric pressure ionization probe (UniSpray™). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2020**;189:113422.
43. Koster RA, Niemeijer P, Veenhof H, Van Hateren K, Alffenaar JWC, Holst JJ. A volumetric absorptive microsampling LC–MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects. *Bioanalysis*. **2019**;11(6):495–508.

**KOPIE OPUBLIKOWANYCH PRAC WŁĄCZONYCH DO CYKLU
DOKTORSKIEGO**

(1) Publikacja oryginalna – oznaczona jako **P₁** [IF=5,60; 140 pkt. MNiSW]
Kocur A, Pawiński T*. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):681.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010681>



Review

Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application

Arkadiusz Kocur and Tomasz Pawiński *

Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

* Correspondence: tomasz.pawinski@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-5720-697

Abstract: Miniaturisation and simplification are novel approaches in clinical bioanalysis, especially in therapeutic drug monitoring (TDM). These contemporary trends are related to the sampling, pre-treatment, and analysis of biological fluids. Currently, dried blood spot (DBS), one of the most popular microsampling techniques, is feasible and inexpensive. However, obtaining reliable results with sample homogeneity and volume variability is difficult. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) has recently enabled the accurate and precise collection of a fixed blood volume. It reduced the hematocrit effect, improved volumetric accuracy, and generated results correlating with the dose and drug exposure from wet blood. This review focuses on VAMS-Mitra™ devices, which have become increasingly important since 2014, mainly for TDM and toxicology studies. First, the current literature has been reviewed based on immunosuppressants and their determination in samples obtained using Mitra™. Second, the critical points, weaknesses, and strengths have been characterized in contrast to classic venipuncture and other microsampling methods. Finally, we indicate the points of attention according to the perspective of Mitra™ as well as its usefulness in clinical practice. VAMS is currently state-of-the-art in microsampling and seems to be a good instrument for improving adherence to immunosuppressive therapy, especially in the pediatric population.

Keywords: microsampling; therapeutic drug monitoring; personalized therapy; immunosuppressants; VAMS; transplantation



Citation: Kocur, A.; Pawiński, T. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 681. <https://doi.org/10.3390/ijms24010681>

Academic Editor: Satoshi Masuda

Received: 30 November 2022

Revised: 14 December 2022

Accepted: 28 December 2022

Published: 30 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Agents

Pharmacotherapy with some drugs, especially those characterized by a narrow therapeutic index (NTIDs), requires the determination of their concentrations in body fluids to avoid under- or overdosing [1]. Therapeutic drug monitoring (TDM) is necessary during therapy with widely used antiepileptics (carbamazepine, valproic acid, and phenytoin), antipsychotics (clozapine and lithium salts), aminoglycosides (gentamicin), digoxin, and rarely antifungal, antiviral, and biological drugs. Immunosuppressants, including tacrolimus (TAC), cyclosporine (CSA), sirolimus (SIR), everolimus (EVE), and mycophenolic acid (MPA), are among the most frequently monitored drugs in the TDM process. Additionally, some studies have exceptionally justified the monitoring of MPA, such as side effects, unpredictable pharmacokinetics in personalized therapy, and detection of adherence to the therapy level [1,2]. A few main factors determine the necessity of TDM of immunosuppressants: narrow therapeutic window and targeted concentration range, severe consequences of missing therapeutic drugs (drug toxicity/graft dysfunction), high dose/exposure ratio, and critical adherence to the therapeutic regimen [3,4].

TAC is a calcineurin inhibitor, the cornerstone of immunosuppressive therapy after solid organ transplantation (SOT) in adult and pediatric transplant recipients. Due to unpredictable intraindividual pharmacokinetics (PK) and high inter-individual variability, improvements in TDM, including sampling, are still needed. TAC's target steady-state concentration range varies from 5 to 20 ng/mL (during the initiation of therapy, from

2 ng/mL) in adults and children. TAC binds strongly to red blood cells (RBC) at approximately 85%; therefore, whole blood is a suitable matrix for drug determination. The trough concentration (C_{trough}) is a routine PK parameter monitored during the TDM of TAC. The stability of TAC as an analyte at ambient temperature (room temperature, RT) was the highest among all the immunosuppressive drugs (14 days). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most popular method for TAC determination because over 50% of TDM laboratories have declared this method a routine TAC quantification protocol. Rarely, immunochemical assays (IA) are used to monitor TAC, namely, the enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT), antibody-conjugated magnetic immunoassay (ACMIA), chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), and quantitative microsphere system (QMS). Limited sensitivity and selectivity are regarded as fundamental flaws of IAs. The International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT) recommends LC-MS/MS as a reference for immunosuppressant determination because the superior specificity and selectivity of this technique allows for a balance between dosages in the therapeutic range during immunosuppressive pharmacotherapy [1,4–6].

CSA is also used for treatment after SOT and is interchangeable with TAC. The mechanism of action is based on the indirect inhibition of calcineurin via direct binding to the cyclophilin complex [7]. LC-MS/MS is the gold standard for CSA determination, but IAs are also used in this case, such as EMIT, ACMIA, CMIA, ECLIA, and cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA). The estimated concentration range was 50–350 ng/mL and 480–2000 ng/mL for C_0 and C_2 (concentration measured before dosing and after 2 h of drug administration) PK parameters, respectively. The most suitable matrix for CSA determination is whole blood because this drug is partly bound to RBC (~41–58%). The stability of the CSA in the samples was experimentally determined within seven days [1,4].

SIR and EVE are mTOR kinase inhibitors in whole blood because of their strong binding to RBC (95% and 75%, respectively). The stability values in RT were similar to those in CSA for both drugs. The estimated concentration ranges oscillate at 3–20 ng/mL and 3–15 ng/mL for SIR and EVE, respectively [1,8]. LC-MS/MS is also recommended as a reference method for SIR and EVE determination by IATDMCT. However, IAs (CMIA, AC-MIA, EMIT for SIR, and QMS for EVE) have also been performed, particularly in smaller TDM laboratories [1,8].

An Inosine-dehydrogenase-monophosphate inhibitor (IMPDH), MPA, administered as a prodrug, mycophenolate mofetil (MMF), or the sodium salt of MPA, should be determined in different matrices. In total, 99.9% of the dose is distributed in the plasma; therefore, EDTA-plasma is preferentially recommended as a suitable target for the TDM of MPA. The typical concentration observed in the TDM samples varied between the 1–4 µg/mL concentration range. Relatively high values allow the determination of MPA using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC/UV) and LC-MS/MS. Guidelines recommend both techniques as the reference gold standard for MPA quantification. Typical IAs used for MPA determination are similar to previously reported analytes (EMIT and CEDIA); however, the particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) and IMPDH-based enzyme inhibition assays are characteristic only for MPA quantification [1,2].

As a systematic approach, conventional venipuncture is the gold standard in clinical practice for toxicology, drug monitoring, and morbidity diagnosis. During this procedure, a higher volume of whole blood is collected (>0.1–5 mL) in relation to the microsampling methods. The main disadvantage of phlebotomy is its invasiveness. Additionally, reliable sample examination is complicated by the unique requirements for storage and delivery to the diagnostic laboratory. Medical staff must collect invasive samples because of the appropriate high quality of the sample. Venous blood is collected from the elbow, arm, and forearm, whereas capillary blood may be collected from the earlobe, forearm, heel, palm, and fingertip. Fingerpricking is noninvasive, painless, and more straightforward than classic venipuncture. It should be noted that the results of microsampling methods

should be evaluated using the reference venipuncture method; however, in most cases, equivalence with or without correction factors has been demonstrated [9,10].

TDM of immunosuppressants requires frequent blood sampling to determine overall drug exposure and dose adjustment. The most critical part of the analytical process is selecting a suitable sampling method and sample preparation. Because of the prevalence of extremely sensitive and accurate analytical techniques, efforts are being made to minimize the amount of material collected for research while maintaining appropriate sensitivity. Microsampling is a noninvasive procedure with small body fluid volumes, usually less than 50 μL [11,12]. In clinical chemistry, nonvolumetric methods, such as capillary microsampling (CMS) and dried blood spots (DBS), have well-established positions. Characteristic problems for nonvolumetric techniques, especially DBS, include the volcano effect, the hematocrit effect, and limited sample homogeneity. These problems and the desire to reduce the amount of material collected for research have contributed to the development of new volumetric absorption microsampling (VAMS) techniques that have gained importance for monitoring therapy in recent years [10]. Microsampling has numerous advantages, which make it more attractive [11–13], namely, even 200 times less collected whole blood volume than classic phlebotomy, less invasiveness for patients, especially children, home-based sampling, and simple sample collection, storage, and delivery/shipment. The biological risk is minimized because of small biological fluid volumes and self-sampling with safe one-use lancets. However, limited data on the clinical application of these devices, higher unit prices, and special analytical equipment with higher sensitivity (LC-MS/MS system) may be treated as limitations of microsampling [12].

In that review, particular focus was placed on the VAMS—Mitra™ utility in immunosuppressant TDM. Additionally, other volumetric devices have been described based on immunosuppressive agent monitoring.

To our knowledge, this is the first comprehensive analytical and clinical review of the utility of VAMS devices for immunosuppressant monitoring.

2. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in the Current Literature (2014–2022)

Volumetric absorptive microsampling (VAMS), introduced by Neotheryx LLC (Torrance, CA, USA), was used to collect blood samples at the end of 2016. It is a high-precision volumetric technology named Mitra™, developed by Dennif and Spooner in 2014 [13–15]. More than 100 different investigations focusing on the VAMS-Mitra™ device have been performed. Keeping up with the producer, the Mitra™ device is characterized by an uncomplicated design; namely, the micro sampler contains the tip set on the sampler body with ribs, a barrel, and the distal end. The sampler tip is built using a hydrophilic porous polymer, which rapidly wicks biological fluids, such as whole blood, serum, urine, breast milk, spinal liquid, and saliva. On the market, three volumes of tips are available: 10 μL , 20 μL , and 30 μL .

The first is dedicated to small molecules, the second to biochemical analysis, and the third is designed for genetic and molecular biology methods. A total of 10 μL is commonly used for drug monitoring in LC-MS/MS analyses, 20 μL tips are required for larger molecules (e.g., protein-based biomarkers or immunoassay methods), and 30 μL is used in molecular diagnostics (for example, RNA/DNA extraction) [12,15].

Generally, larger volumes of tips contain larger pores. Therefore, larger molecules may be analyzed in this type of VAMS. For every pack of VAMS, the analytical certificate is added, with information about the exact volume of samplers in that lot (with RSD < 4%) [15]. The sampler body had ribs that prevented the samples from encountering the walls of the extraction tube. The barrel is used for the labeled sampler, whereas the distal end is suitable for standard automatic hand pipettes smaller than 200 μL volume [13,15]. The VAMS tips absorbed whole capillary blood within a few seconds (2–4 s range) and dried rapidly at room temperature (RT) for a maximum of 2 h. The drying process increases the stability level of the sample, and transport of that sample is more accessible because of logistic reasons. The tip may or may not be removed from the handler before the extraction [13,15].

For example, the body fluid may be collected in situ from the finger previously disinfected and punctured by a classic lancet. The first blood drop should be discarded, and the sampler may collect the second capillary drop. In the case of blood, where the fluid is colored, the assessment of the wick grade is more accessible than in other fluids (which are colorless or the color is not significant), and the sample is successfully collected when the entire tip is red. The collection process appeared to be extremely easy and could be performed without special training, similar to measuring blood sugar levels. The Mitra™ device is classified by the FDA as class 1, with an accurate and precise collection of a fixed blood volume [11,15].

The sampler may be left for drying and storage in a 96-placed autorack, 1–4 placed clamshells, or 2-placed cartridges. Samples were placed in zip bags in the dark with desiccant and delivered to the laboratory via classic mail. VAMS can be analyzed manually step-by-step with the possibility of automatization [13–16].

The VAMS sample method from the patient to the medical laboratory and the results obtained using the classic critical point are presented in Figure 1. In the following section, all steps are described according to the current literature and therapeutic drug monitoring of immunosuppressive agents, including clinical outcomes.

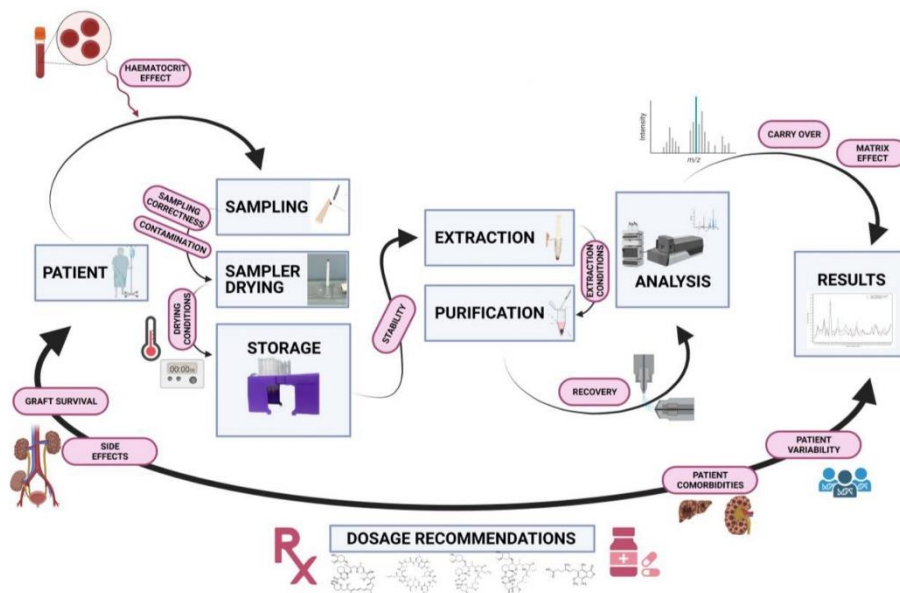


Figure 1. Preanalytical, analytical, and clinical process summary with the main critical points. Created with BioRender.com under publishing rights.

2.1. Pre-Sampling

In the case of VAMS, the tip with adsorbed blood may or may not be removed by the plastic handler. The unique patient label bar code could be present during the preparation process until the end of extraction. Ideally, the sampler should be incorporated with IS before sample collection, but this approach may be problematic in most studies because of stability reasons and potential home-sampling destiny. All devices were equipped with barcode labels, allowing for sample confusion in potential process automation.

When using microsampling as a potential device for self-sampling by inexperienced patients, extensive training by medical staff is greatly needed, as well as regular revision

during follow-up visits. Explicit sampling instruction, tutorial videos, and other supplementary materials are excellent addendums for pre-sampling process correction [12–15].

2.2. Sampling

Denniff and Spooner thoroughly studied the potential difficulties encountered during sampling by VAMS [12,16,17]. Sampling from a greasy finger caused a 10% lower wicking by the tip concerning the disinfected finger. Accidentally dropping the sampler into the floor caused approximately 3% analyte loss [12,16]. The physical contact of the loaded tip with other materials, such as an unloaded tip and paper, caused 10 and 19% of analyte loss, respectively [12,16]. However, the above study focused on simple analytes such as caffeine, paracetamol, and midazolam, but different scenarios should be performed during method development and validation in the case of immunosuppressants [17]. Because of the variable volumes of tips, the total time of filling by blood may be different. The potential problems indicated during sampling are shown in the figure. Following manufacturer guidelines, the tip should be dry under ambient conditions, especially at room temperature (RT) and relative humidity of 55% for one hour, but no longer than 24 h [15]. In microsampling studies of immunosuppressant agents, different approaches to drying times have been observed (Table 1) [16,17].

Some studies have reported that 24 h is a suitable time for drying VAMS samplers under ambient conditions. In our study about TAC [18], a reduction in the drying time to 1 h ensures a high recovery of TAC and no significant differences between the 2 h and 1 h period of VAMS drying. Vethe et al. [19] reported that 3 h of VAMS drying is satisfactory; however, Kita et al. [20,21] and Koster et al. [22] reported that the period of drying VAMS may be reduced to 2 h with no significant differences in TAC extraction accuracy.

In a comparison study of DBS and VAMS, all samples for DBS were collected with acceptable visual quality by a phlebotomist and by 94.1% of transplant patients. In the case of VAMS, samples for the simultaneous determination of TAC and MPA were collected with 95.2% and 70.6% accuracy for the phlebotomist and self, respectively [22]. It does not prejudice more difficult sampling with VAMS over DBS but confirms the necessity of intensive training before VAMS self-patient sampling. The hematocrit (HCT) effect (described in Section 4.1), blood density, co-medications with anticoagulant drugs, and individual patient comorbidities may directly impact the sampling process [23–25].

Table 1. Summary of the preanalytical characteristics of immunosuppressive drug assays using VAMS microsampling techniques.

Drug Name	Matrix	Sample Volume	Storage	Drying Method	Sampling Correctness	Microsampling Device	Reference
CSA	fingerprick CB	20 µL	n.d	n.d	n.t.	Mitra™	[22]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[23]
	fingerprick CB	20 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	Mitra™	[26]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[27]
TAC	fingerprick CB	10 µL	RT, ambient conditions	RT, 3 h	satisfactory	Mitra™	[19]
	fingerprick CB	10 µL	RT, ambient conditions	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[20]
	tail prick CB	10 µL	freezing in tube	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[21]
	fingerprick CB	20 µL	n.d	n.d	n.t.	Mitra™	[22]

Table 1. Cont.

Drug Name	Matrix	Sample Volume	Storage	Drying Method	Sampling Correctness	Microsampling Device	Reference
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	MS: 95.20% SS: 70.06%	Mitra™	[23]
	fingerprick CB	20 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	Mitra™	[26]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[27]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 24 h	67.7%	Mitra™	[28]
	fingerprick CB	10 µL	RT, ambient conditions	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[29]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[30]
	fingerprick CB	10 µL	4 °C, darkness	RT, 1 h	n.t.	Mitra™	[18]
	fingerprick CB	20 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	Mitra™	[31]
	fingerprick CB	10 µL	At least 24 h in a specimen bag	RT, 24 h	n.t.	HemaXis™	[32]
	fingerprick CB	20 µL	n.d.	n.d.	n.t.	Mitra™	[22]
MPA	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	MS: 95.20% SS: 70.06%	Mitra™	[23]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[30]
	fingerprick CB	10 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	HemaXis™	[32]
	fingerprick CB	20 µL	n.d.	n.d.	n.t.	Mitra™	[22]
EVE	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[23]
	fingerprick CB	20 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	Mitra™	[26]
	fingerprick CB	20 µL	n.d.	n.d.	n.t.	Mitra™	[22]
	fingerprick CB	20 µL	zip-lock bags with desiccant (−20 °C until analysis)	RT, 2 h	n.t.	Mitra™	[23]
SIR	fingerprick CB	20 µL	RT, ambient conditions	RT, 24 h	n.t.	Mitra™	[26]
	fingerprick CB	10 µL	n.d.	n.d.	n.t.	Mitra™	[33]
	fingerprick CB	10 or 20 µL	20 ± 5 °C, <40% humidity, zip-lock bags with desiccant	RT, n.d.	MS: 39.1% (reduced to 13.6%)	Mitra™	[34]

CSA—cyclosporine, TAC—tacrolimus, MPA—mycophenolic acid, EVE—everolimus, SIR—sirolimus, CB—capillary blood, n.t.—not tested, n.d.—no data available in the study, RT—room temperature.

2.3. Sample Preparation (Extraction and Purification)

The extraction process is considered one of the critical points during sample analysis. Different approaches have been observed, such as using non-organic or organic solvents or mixtures. However, Ye and Gao [24] reported that a lower elution strength characterized a mixture of organic solvents and water, and they used particulars relatively more frequently. In some protocols, organic solvents, such as acetonitrile or methanol, were used, but they may influence analyte recovery by chopping the porous tip due to protein denaturation. According to presented TAC determination study, water was used as simple and satisfactory

extraction medium. The detailed characteristics of all VAMS extraction and purification protocols are presented in Table 2.

In pilot proficiency testing, it has been pointed out that in most laboratories, IS is added during extraction, and only in one case directly on the sample or after extraction [35]. Bought calibrators and QC (Quality Control) were used in more than 60% of laboratories, whereas self-made solutions were used in the others [35]. Zinc sulphate and acetonitrile were the most frequently used solvents for sample purification, whereas organic and water mixtures were used in almost all cases for the extraction protocol. Vortexing and centrifugation are the most popular mechanical techniques for sample cleaning. Gruzdys et al. [26] presented modifications according to sample cleaning, namely, the evaporation of the sample after extraction has been connected with reconstitution with organic solvents and mechanic centrifugation.

2.4. Analytical Assay Characteristics

Chromatographic methods, especially LC-MS/MS, are considered the gold standard for small molecule determination in limited body fluid volumes, especially immunosuppressants and other NTIDs. These methods are primarily based on electrospray ionization (ESI) positive mode with a triple quadrupole detector. Paniagua-Gonzales compared ESI and unispray (US) devices for immunosuppressive MS assays [23].

Table 2. Summary of sample preparation characteristics of immunosuppressive drug assays in common with microsampling techniques.

Drug Name	Microsampling Method	Extraction Solvent	Extraction Conditions	Solvent for Sample Purification	Purification Conditions	Additional Steps	Reference
CSA	Mitra™	methanol: water (with IS); (40:60, v/v%)	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min, low speed, 1 min maximal speed), sonication (15 min), vortexing (the same conditions as above), centrifugation (5 min, 10,000 g), and storage at −20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[22]
	Mitra™	methanol (with IS); (62.5:37.5, v/v)	sonication (15 min)	methanol	sonication (15 min), centrifugation (5 min, 14,500 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[23]
	Mitra™	methanol: water (with IS); (80:20, v/v)	sonication (15 min), vortexing (60 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	n.d.	vortexing (15 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[26]
	Mitra™	IS solution	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min), sonication (15 min), centrifugation (5 min, 13,000 g), storage at −20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[27]

Table 2. Cont.

Drug Name	Microsampling Method	Extraction Solvent	Extraction Conditions	Solvent for Sample Purification	Purification Conditions	Additional Steps	Reference
TAC	Mitra™	water	shaking (15 min)	methanol: zinc sulphate (2:1, v/v)	shaking (6 min) centrifugation (2000 g, 10 min, 4 °C)	n.d.	[19]
	Mitra™	methanol: water (1:1, v/v)	sonication (15 min)	methanol: acetonitrile (1:1, v/v)	centrifugation (13,000 g, 5–15 min, 4 °C),	n.d.	[20]
	Mitra™	methanol: water (1:1, v/v)	sonication (15 min)	methanol: acetonitrile (1:1, v/v)	centrifugation (13,000 g, 15 min, 4 °C),	n.d.	[21]
	Mitra™	methanol: water (with IS); (40:60, v/v%)	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min, low speed, 1 min maximal speed), sonication (15 min), vortexing (the same conditions as above), centrifugation (10,000 g), and storage at –20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[22]
	Mitra™	methanol (with IS); (62.5:37.5, v/v)	sonication (15 min)	methanol	sonication (15 min), centrifugation (5 min, 14,500 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[23]
	Mitra™	methanol: water (with IS); (80:20, v/v)	sonication (15 min), vortexing (60 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	n.d.	vortexing (15 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[26]
	Mitra™	the internal standard solution	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min), sonication (15 min), centrifugation (5 min, 13,000 g), storage at –20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[27]
	Mitra™	methanol: water (with IS), (80:20, v/v)	sonication (30 min)	methanol and zinc sulphate solution	vortexing (15 min), sonication (15 min), vortexing (15 min), centrifugation (10,000 g, 5 min), and storage at –20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[28]
	Mitra™	water with IS (50:50, v/v)	shaking (15 min), sonication (10 min),	acetonitrile and zinc sulphate mixture (1:1, v/v)	centrifugation (16,260 g, 5 min, 8 °C)	salting out with ammonium sulphate	[29]
	Mitra™	50% methanol solution	sonication (10 min), vortexing (20 min)	acetonitrile and zinc sulphate mixture (1:1, v/v) with IS	shaking (10 min) centrifugation (2900 rpm, 5 min)	n.d.	[30]
Mitra™	water	shaking (60 min)	acetonitrile and zinc sulphate mixture (1:1, v/v)	shaking (10 min) centrifugation (3500 rpm, 10 min, 4 °C)	n.d.	[18]	

Table 2. Cont.

Drug Name	Microsampling Method	Extraction Solvent	Extraction Conditions	Solvent for Sample Purification	Purification Conditions	Additional Steps	Reference
	Mitra™	acetonitrile: water (40:60, v/v%)	vortexing (10 min), sonication (15 min), vortexing (10 min)	acetonitrile with IS	vortexing (5 min), centrifugation (11,337 g, 5 min)	n.d.	[31]
	HemaXis™	IS solution in methanol	vortexing (15 min)	zinc sulphate solution	centrifugation (16,000 g, 5 min)	n.d.	[32]
MPA	Mitra™	methanol: water (with IS); (40:60, v/v%)	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min, low speed, 1 min maximal seed), sonication (15 min), vortexing (the same conditions as above), centrifugation (10,000 g), and storage at −20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[22]
	Mitra™	methanol (with IS); (62.5:37.5, v/v)	sonication (15 min)	methanol	sonication (15 min), centrifugation (5 min, 14,500 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[23]
	Mitra™	50% methanol solution	sonication (10 min), vortexing (20 min)	acetonitrile and zinc sulphate mixture (1:1, v/v) with IS	shaking (10 min), centrifugation (2900 rpm, 5 min)	n.d.	[30]
	HemaXis™	IS solution in methanol	vortexing (15 min)	zinc sulphate solution	centrifugation (16,000 g, 5 min)	n.d.	[32]
	Mitra™	methanol: water (with IS); (40:60, v/v%)	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min, low speed, 1 min maximal seed), sonication (15 min), vortexing (the same conditions as above), centrifugation (10,000 g), and storage at −20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[22]
EVE	Mitra™	methanol (with IS); (62.5:37.5, v/v)	sonication (15 min)	methanol	sonication (15 min), centrifugation (5 min, 14,500 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[23]
	Mitra™	methanol: water (with IS); (80:20, v/v)	sonication (15 min), vortexing (60 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	n.d.	vortexing (15 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[26]
SIR	Mitra™	methanol: water (with IS); (40:60, v/v%)	sonication (30 min)	methanol	vortexing (15 min, low speed, 1 min maximal seed), sonication (15 min), vortexing (the same conditions as above), centrifugation (10,000 g), and storage at −20 °C (10 min), centrifugation (the same conditions above)	n.d.	[22]
	Mitra™	methanol (with IS); (62.5:37.5, v/v)	sonication (15 min)	methanol	sonication (15 min), centrifugation (5 min, 14,500 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[23]

Table 2. Cont.

Drug Name	Microsampling Method	Extraction Solvent	Extraction Conditions	Solvent for Sample Purification	Purification Conditions	Additional Steps	Reference
	Mitra™	methanol: water (with IS); (80:20, v/v)	sonication (15 min), vortexing (60 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	n.d.	vortexing (15 min), centrifugation (10 min, 18,403.2 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[26]
	Mitra™	methanol with IS	sonication (15 min)	n.d.	vortexing, centrifugation (10 min, 15,000 g)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[33]
	Mitra™	water with IS (20:1, v/v)	sonication (20 min)	LLE with tert-butyl-methyl-ether	freezing (−60 °C)	evaporation to dry, reconstitution with the mobile phase	[34]

CSA—cyclosporine, TAC—tacrolimus, MPA—mycophenolic acid, EVE—everolimus, SIR—sirolimus, n.d.—no data available in the study, IS—internal standard, LLE—liquid–liquid extraction.

Preferentially, the validation of the method according to a few analytes is currently observed—TAC, CSA, MPA, EVE, SIR, and PRE may be developed in a single run. Creatinine level is an additional biomarker for monitoring graft function in patients after renal transplantation. Using VAMS, the metabolite levels could also be measured. In the study by Scuderi et al., the MPAG level (mycophenolic acid glucuronide) was quantified. Although different MRM pairs (quantitative and control) for MPA and MPAG were established, the effect of metabolite fragmentation was negligible [30]. The selected apparatus and chromatographic parameters for all prescribed methods are presented in Table 3. Only Gruzdys et al. presented limited data on chromatographic and MS detector working conditions during analysis [26].

Table 3. Summary of analytical characteristics of immunosuppressive drug assays in common with microsampling techniques.

Drug Name	Analytical Method	Injection Volume	Selected Chromatographic Conditions	Internal Standard	Selected Apparatus Conditions	Calibration Range (Linearity)	Reference
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	D ₁₂ -CSA	RF lens = 93 V CE = 15 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	10–500 ng/mL	[22]
CSA	(+)ESI-LC-MS/MS and US-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate and formic acid in water and acetonitrile flow rate: 0.5 mL/min, gradient flow	D ₄ -CSA	CV = 20 V CE = 19 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	20–2000 ng/mL	[23]
	(+)ESI-LC-MS/MS	35 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: n.d., flow rate: n.d. gradient flow	D ₁₂ -CSA	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	22.7–937.0 ng/mL	[26]
	(+)ESI-LC-MS/MS	40 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	D ₁₂ -CSA	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–1904 µg/L	[27]

Table 3. Cont.

Drug Name	Analytical Method	Injection Volume	Selected Chromatographic Conditions	Internal Standard	Selected Apparatus Conditions	Calibration Range (Linearity)	Reference
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₈ chromatographic column, mobile phase: water with formic acid and ammonium acetate and methanol with formic acid ammonium acetate., flow rate: 0.60mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = 82 V CE = 23 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1.3–60 µg/L	[19]
	(+)ESI-LC-MS/MS	3 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: water, and methanol (with acetic acid), flow rate: 0.25 mL/min, gradient flow	ASC	RF lens = 60 V CE = 40 eV positive mode	1–250 ng/mL	[20]
	(+)ESI-LC-MS/MS	3 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: water and methanol (with ammonium acetate and acetic acid) flow rate: 0.35 mL/min, gradient flow	ASC	RF lens = 40 V CE = 27 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	0.2–250 ng/mL	[21]
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = 82 V CE = 20 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1–50 µg/L	[22]
	(+)ESI-LC-MS/MS and US-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate and formic acid in water and acetonitrile flow rate: 0.5 mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	CV = 22 V CE = 20 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	0.5–50 ng/mL	[23]
TAC	(+)ESI-LC-MS/MS	35 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: n.d., flow rate: n.d. gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.20–41.30 ng/mL	[26]
	(+)ESI-LC-MS/MS	40 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.18–42.4 µg/L	[27]
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = 82 V CE = 20 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1–50 µg/L	[28]
	(+)ESI-LC-MS/MS	10 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: 95% acetonitrile and 5% 10 mM ammonium acetate in water, flow rate: 0.1–0.6 mL/min, isocratic flow	ASC	RF lens = 135 V CE = 20 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.25–42.9 ng/mL	[29]
	(+)ESI-LC-MS/MS	n.d.	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium acetate with formic acid in water and methanol, flow rate: 0.4 mL/min, gradient flow	¹³ C ₆ D ₂ -TAC	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–40 µg/L	[30]
	(+)ESI-LC-MS/MS	10 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: water with ammonium fluoride and formic acid, and methanol: acetonitrile with ammonium fluoride and formic acid, flow rate: 0.75 mL/min, gradient flow	ASC	CV = n.d. CE = 22 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–60 µg/L	[18]

Table 3. Cont.

Drug Name	Analytical Method	Injection Volume	Selected Chromatographic Conditions	Internal Standard	Selected Apparatus Conditions	Calibration Range (Linearity)	Reference
MPA	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium acetate buffer with 0.1% formic acid and ammonium acetate in methanol with 0.1% formic acid, flow rate: 0.4 mL/min, gradient flow	ASC	CV = 27 V CE = 20 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1.45–29.28 µg/L	[31]
	(+)ESI-LC-MS/MS	50 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	ASC	RF lens = 35 V CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.23–84 µg/L	[32]
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: 20 ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₃ -MPA	RF lens = 58 V CE = 22 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	100–1500 ng/mL	[22]
	(+)ESI-LC-MS/MS and US-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate and formic acid in water and acetonitrile flow rate: 0.5 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₃ -MPA	CV = 30 V CE = 15 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	75–7500 ng/mL	[23]
	(+)ESI-LC-MS/MS	10 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₃ -MPA	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0.5–20 mg/L	[27]
	(+)ESI-LC-MS/MS	n.d.	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium acetate with formic acid in water and methanol, flow rate: 0.4 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₃ -MPA	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–20 mg/L	[30]
	(+)ESI-LC-MS/MS	50 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₃ -MPA	RF lens = 35 V CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–20 mg/L	[32]
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	RF lens = 88 V CE = 16 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1–50 µg/L	[22]
	(+)ESI-LC-MS/MS and US-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate and formic acid in water and acetonitrile flow rate: 0.5 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	CV = 20 V CE = 16 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	0.5–50 ng/mL	[23]
	(+)ESI-LC-MS/MS	35 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: n.d., flow rate: n.d. gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.3–44.2 ng/mL	[26]
EVE	(+)ESI-LC-MS/MS	40 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–41.6 µg/L	[27]
	(+)ESI-LC-MS/MS	5 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: 20 mM ammonium formate in water and methanol flow rate: 0.4 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	RF lens = n.d. CE = 30 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.5–100 µg/L	[33]

Table 3. Cont.

Drug Name	Analytical Method	Injection Volume	Selected Chromatographic Conditions	Internal Standard	Selected Apparatus Conditions	Calibration Range (Linearity)	Reference
	(+)ESI-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate buffer pH 3.5 and methanol, flow rate: 1 mL/min, gradient flow	temsirolimus	RF lens = 83 V CE = 15 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1–50 µg/L	[22]
	(+)ESI-LC-MS/MS and US-LC-MS/MS	20 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: ammonium formate and formic acid in water and acetonitrile flow rate: 0.5 mL/min, gradient flow	¹³ C ₂ D ₄ -EVE	CV = 22 V CE = 16 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	0.5–50 ng/mL	[23]
SIR	(+)ESI-LC-MS/MS	35 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: n.d., flow rate: n.d. gradient flow	¹³ C ₃ D ₃ -SIR	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	2.20–47.20 ng/mL	[26]
	(+)ESI-LC-MS/MS	40 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: formic acid, ammonium in water and methanol, flow rate: 0.45 mL/min, gradient flow	¹³ C ₃ D ₃ -SIR	RF lens = n.d. CE = n.d. positive mode (ammonium adduct monitoring)	0–47 µg/L	[27]
	(+)ESI-LC-MS/MS	10 µL	C ₁₈ chromatographic column, mobile phase: 0.1% formic acid and methanol, flow rate: 0.6 mL/min, gradient flow	¹³ C ₃ D ₃ -SIR	RF lens = 100 V CE = 58 eV positive mode (ammonium adduct monitoring)	1–250 ng/mL	[34]

CSA—cyclosporine, TAC—tacrolimus, MPA—mycophenolic acid, EVE—everolimus, SIR—sirolimus, n.d.—no data available in the study, (+)ESI-LC-MS/MS—liquid chromatography-tandem mass spectrometry in positive ion mode, US-LC-MS/MS—liquid chromatography-tandem mass spectrometry with unispray, RF lens—radio frequency lens voltages, CE—collision energy, CV—cone voltage, D₄-CSA/D₁₂-CSA—deuterated cyclosporin, ASC—ascromycin, ¹³C₂D₂-TAC—deuterated tacrolimus, ¹³C₃D₃-MPA—deuterated mycophenolic acid, ¹³C₂D₄-EVE—deuterated everolimus, ¹³C₃D₃-SIR—deuterated sirolimus.

2.5. Clinical Outcome

Several factors may have influenced the patients' clinical picture, including comorbidities, co-medications, and intertemporal PK variability. The side effects of pharmacotherapy, adherence to therapy, and graft conditions are individual for every patient may strongly influence clinical decisions regarding dosage recommendations.

Paniagua-Gonzalez et al. reported that the VAMS method for TAC and MPA determination was equivalent to the wet blood method reference, but correction factors were introduced. Mean differences were acceptable for both analytes based on Bland–Altman plots (2.20% and 2.04% bias for TAC and MPA, respectively) [23]. In a study by Scuderi et al., systematic bias was identified for TAC, and the correction of its values showed no significant differences. No statistical differences were observed between MPA and PRE in this case [30]. In the case of the newest analytical method for EVE determination, no systematic bias or HCT effect was observed, and a strong correlation between wet blood and VAMS was evaluated [33,34]. Zwart et al. deduced that the VAMS technique was generally worse than DBS, but it seems to be an attractive alternative in certain situations (i.e., for graft monitoring) [27,32]. In a study by Gruzdyts et al. on four immunosuppressive agents, the highest proportional bias was observed only in the case of TAC (15%, intercept 0.3 ng/mL) [26]. The microsampling method collection and extraction showed statistically calculated CV% < 10%, excluding SIR. In two studies by Kita, the methods of tacrolimus determination were suitable for PK monitoring of TAC based on a study performed on rats [20,21]. For clinical use of this method, a correction formula based on Deming regression was introduced because of the relatively high impact of HCT during EVE determination. Vethe et al. deduced that two tips should be collected simultaneously (for eventual analysis repetition), but differences in TAC concentration between hospital

sampling and home-based self-sampling were lower than 10% [19]. A strong correlation between the reference wet blood method and microsampling TAC determination was demonstrated in a study by Tron et al. [29]. More than 90% of the differences evaluated by the Bland–Altman plot were within the acceptable range [29]. Mathew [31] performed simultaneous assays of tacrolimus and creatine concentrations in VAMS and concluded that Mitra™ is a better option than DBS for renal function monitoring after transplantation. Veenhof et al. presented three different factors in their study, which influenced the higher systematic bias, i.e., anticoagulant impact, extraction solvent, and/or invisible under sampling [28].

3. Around VAMS—Strengths, Weaknesses, and Relevant Aspects

This section describes selected problems, points of attention, and propositions for solving frequent analytical and preanalytical difficulties. A summary of our proposal for the issue evaluation is presented in Table 4.

Table 4. Potential solutions for selected analytical and preanalytical aspects of microsampling.

Difficulty	Workable Solutions
hematocrit effect	Testing hematocrit effect in case of validation and every method modification and introducing correction formula based on, e.g., potassium level and/or Modification attempts in extraction parameters and/or Monitoring of self-sampling correctness with a simple questionnaire and/or Monitoring of hematocrit levels according to drug concentrations regularly
mistakes in self-sampling	Regular revision of sampling training for patients and/or Good availability of explicit sampling instruction for patients and/or Additional resources, i.e., as tutorial videos for patients and/or Monitoring of self-sampling correctness with a simple questionnaire and/or Responsible guardians/parents care during sample collection (in the case of pediatric patients)
limited sample stability	Limited whole blood dilution through low volumes of calibrators and other solutions addition (particularly <5% of sample volume) and/or Clear guidelines about sample storage and preparing to send for patients (according to desiccant and drying) and/or Modification of method protocol—controlling every step according to influence for sample stability (During validation, according to EMA/FDA guidelines)
IS incorporation step	Impregnation of the sampler with IS before sample collecting or Spiking the samples before or after the extraction process or/and The two-stage approach according to liquid–liquid extraction or/and Changing of internal standard (another structural analog or isotope-stable internal standard)

Table 4. Cont.

Difficulty	Workable Solutions
drying conditions (time, temperature, and humidity)	Testing selected parameters during method development (in-vitro conditions) and/or Drying and sample storage in controlled conditions and/or Clear guidelines about sample storage and preparing to send for patients (according to desiccant and drying)
	Collecting a few samples at the same time (Simultaneously, replicate samples) and/or Collection of the higher volume of whole blood prior to microsampling
sample reanalysis necessity	In-vitro validation according to potential chemical contamination (creams, petroleum, etc.) and/or Appropriate disinfection of hands before fingerprick by patients and/or Using another microsampling method with limited contamination risk (i.e., HemaPen™) and/or Responsible guardians/parents care during sample collection (in the case of pediatric patients)
sampler contamination	Optimization analytes recovery and/or Optimization sample purification and extraction protocol and/or Changing analytical method/apparatus/chromatographic column/detector conditions, etc. and/or The balance between sample injection volume and chromatographic parameters and/or Testing of method automatization
analytical method sensitivity	

3.1. Hematocrit Effect

Haematocrit is the percentage ratio of RBC in the blood volume. Usually, this parameter ranged between 40–50% and 35–45% for adult men and women. In neonates, the HCT level may increase in the first days of life and oscillate to 65% of RBC in whole blood volume [24,25]. Factors influencing HCT level were sex, age, comorbidities, ethnicity, and polypharmacotherapy. In particular, the hematocrit level directly represented blood viscosity, and the density–variability of these parameters significantly influenced the sample quality and analyte recovery from the microsampling device (tip or spot). Volumetric microsampling (including volumetric methods in common with DBS) appears to be an alternative to the HCT effect. However, the manufacturer of the Mitra™ device reported that the HCT level did not influence sample recovery, and some studies have evaluated this effect during validation. Some approaches have been introduced to evaluate and predict the HCT effect in the case of DBS and VAMS. Correction with potassium level is considered a marker for HCT prediction in DBS and VAMS. HCT may play a vital role in some analytes, especially those with high RDB-binding sites, such as TAC and CSA [25].

In both studies, Paniagua-Gonzales et al. [23] evaluated that the HCT effect has not been statistically considered, especially during the determination of TAC and MPA. In a study by Scuderi et al. [30], correction factors according to HCT were introduced into formulas for calculating MPA and PRE concentrations (as drugs typically analyzed in the plasma). In our study about TAC in the pediatric population, no influence of hematocrit for analyte recovery from VAMS has been evaluated [18].

In the Kita [20,21] study, the impact of HCT on accuracy was examined at three different levels (0.20, 0.45, and 0.65) according to the drug model with high blood partition (TAC). The extraction recovery values and the matrix effect fulfilled the acceptance validation criteria because all values were almost 100% (for both LQC, low quality control, and HQC, high quality control). These studies confirmed that VAMS might be used for TAC

determination in samples with different HCT levels, but further evaluation of other drugs should include other chemical properties.

In the study with everolimus performed in 2018, the biases for low and high HCT values for LQC, MQC (medium quality control), and HQC were diametrically different, ranging from -20 to $+31\%$ [33]. The author hypothesized that a large amount of RBS may chopped analytes in the VAMS tip pores, influencing extraction recovery. It has been proven that the HCT effect and its influence on extraction should be evaluated in every validation process. In a Norwegian study conducted in 2019 by Vetthe et al. [19], water was used as the extraction medium. The recovery from the tip was satisfactory, but the effect of the HCT was not tested.

Tron et al. [29] evaluated the influence of HCT on TAC determination in VAMS samples. No significant effect on TAC concentration was observed in the standard HCT level (0.40) or in the more extensive range of 0.20–0.60 (2.5–30 ng/mL concentration). Koster et al. [22] concluded that biases caused by the HCT effect were within the acceptance range ($<15\%$) for all analytes except CSA (HCT levels 0.20–0.60 and 0.27–0.60, respectively). For HQC, in common with lower HCT levels, recoveries were reduced for mTOR kinase inhibitors.

3.2. Automatization of the VAMS Methods

Many TDM laboratories use automation to increase proficiency, efficiency, and repeatability. Currently, DBS card platforms perform automated spot recognition, punching, and sample extraction. For newborn microsampling techniques such as VAMS, automatization is still required. Only in the study performed by Broek et al., the semi-automated approach during analytical processing has been used. The introduction of VAMS for routine medical care should begin with studies on fully or partially automated protocols for this technique in TDM laboratories. During TDM of drugs, many samples should be collected; therefore, automation of the analytical process is required [36]. The VAMS sampler was designed to be compatible with classic, popular automatic liquid handling systems for potential automatization of sample preparation.

3.3. Sampling in the Home–Point-of-Care (POC) as a Method for Adherence Improvement

The European Society for Patient Adherence, Compliance, and Persistence defined adherence as “the process by which the patients take their medication as prescribed” [37]. Noncompliance with a therapeutic regimen is a complex problem, especially for adolescent and child transplant recipients. A study by Blowey et al. [38] on compliance evaluated by monitoring CSA levels, attending clinic visits, individual interviews, and unexplained late graft dysfunction identified noncompliance as the main factor in late graft loss, accounting for 71% of cases. In a recent study, Rianthavorn et al. [39] noted that that “the long-term transplant outcome in adolescents is disappointing despite the best 1-year graft survival. Non-adherence with immunosuppressive medications is one of the most significant contributing factors for graft rejection and loss in adolescents.” The primary risk of non-adherence may result in low-income family support and the child’s psychological functioning. Other reasons that may cause noncompliance in the pediatric population are shown in Figure 2 [37]. Life-long immunosuppressive therapy is necessary for each patient after transplantation to avoid chronic or acute rejection episodes. Higher immunosuppressant concentration variability (in the case of non-adherence) is associated with acute rejection, decreased graft survival, and an increased cost of therapy. Home-based microsampling (especially VAMS) is an increasingly promising solution to problems associated with adherence to immunosuppressive therapy [37–39].

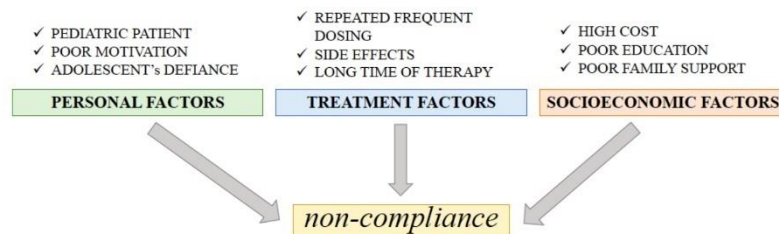


Figure 2. The main factors causing noncompliance in transplant patients [37].

3.4. Proficiency Testing as a Method for Global Standardization

To date, only one multicenter study on proficiency testing was performed by Veenhof in 2017–2019 [35]. Fourteen TDM laboratories from seven countries participated in the pilot test for monitoring five immunosuppressants with microsampling techniques. TAC, CSA, EVE, SIR, and MPA concentrations were tested with LC-MS/MS using the following microsampling devices: DBS (Whatman 903 and DMPK-C) and VAMS (HemaXis™, Mitra™, and Capitainer-B™). In eight laboratories, nonvolumetric DBS was the leading microsampling device; in four participants, the Mitra™ device was used, and one was used for each of the last techniques, namely HemaXis™ and Capitainer-B™. Seven laboratories participated in proficiency testing, joined scarcely in the third round [35]. Therefore, some results should be interpreted carefully. All included laboratories analyzed TAC, eight performed assays for CSA determination, and seven and six of laboratories analyzed EVE and SIR, respectively, whereas only two participants quantified MPA. Fifty percent of the participating laboratories used ASC as the IS, but the validation results were statistically similar to those of the methods with $^{13}\text{C}_2\text{-D}_2\text{-TAC}$ for TAC determination [35].

The extraction procedure is the main factor potentially influencing the high interlaboratory variability. Eight and six laboratories used ZnSO_4 and acetonitrile for sample purification. The high variability of centrifuging and/or vortexing parameters may cause relative differences in proficiency testing results. Half of the laboratories performed clinical validation of their studies, whereas nine routinely used microsampling methods in daily patient healthcare. Finally, Veenhof et al. concluded that harmonization and standardization of the microsampling devices used in the TDM of immunosuppressants are necessary because of the high interlaboratory variability compared to wet blood methods. The main limitation of proficiency testing is that a small number of laboratories participated in the study because the study was performed in 2017–2019 [35]. SIR, EVE, and MPA were analyzed only in the last testing round; therefore, these drug quantifications' results should be interpreted carefully. The main limitation of MPA determination using a microsampling device is the evaluation of the correlation between its values in blood and serum; in that case, standardization of the mathematical formula is also necessary [9,35]. The authors pointed out that global harmonization according to microsampling devices is a potential solution to the problem of high cross-laboratory variability in the results of proficiency testing. It also needs to be clarified that proficiency testing is obligatory for all medical laboratories and microsampling cases, according to International Organization for Standardization (ISO) rules [9,33,40].

3.5. Future Perspective on VAMS for Immunosuppressants TDM

The issues associated with traditional sampling and BDS were overcome by introducing novel microsampling methods. Following a questionnaire study performed by Bioanalysis-zone.com, 29% of the respondents were interested in microsampling in 2014, whereas 49% of the included laboratories started microsampling in 2016. In every case, more than half of the respondents used microsampling to monitor small molecules, including TDM [41]. Based on PubMed [42], 126 studies with significant annual growth have been described according to volumetric microsampling. Twenty of these publications

have been concerned wholly or partly with the utility of immunosuppressive therapy [42]. Preferentially for immunosuppressive therapy, microsampling enables medical doctors and pharmacists to obtain enough biological samples within each drug dosing interval range without specific requirements according to the sampling time. Recently, Mathew et al. [31] reported the successful use of Mitra™ for monitoring TAC and creatinine levels in the Indian population. However, the results obtained from the BDS and VAMS samples were equivalent, but the patients who participated in the study indicated that the Mitra™ device was a better alternative for the self-sampling of blood samples. It seems that interest on the part of patients in the VAMS technique brings a brighter future for microsampling in immunosuppressive pharmacotherapy. The development of microsampling may result in the three branches of the immunosuppressant tract, namely, their components in whole blood, intracellular concentrations, and pharmacodynamic (PD) biomarkers [9,10,43]. Although good clinical results for patients have been observed, more detailed regulatory feedback from medical agencies is still needed, as well as multicenter studies on the clinical application of VAMS. On the other hand, home-based sampling and, consequently, better adherence to therapy can benefit long-term economic aspects. It is estimated that owing to the clear benefits of using VAMS, the utility of this technique and immunosuppressant monitoring will grow annually [9,13].

Gustavsen et al. [44] more extensively used Mitra™ as a valuable tool for venous TAC AUC prediction, using a limited sample strategy (LSS for AUC_{0–12} prediction). The authors pointed out that the study has some limitations in conclusions (such as lack of long-term PK profiles after Tx, variability of TAC absorption, etc.), but constitutes a great utility of microsampling according to population PK. The strict benefit is the possibility of frequent and easy-to-perform sampling in patients' home conditions [44,45]. To date, only Kindem et al. [46] have prescribed the utility of VAMS for TAC determination in pediatric transplant patients. This is proof that future perspectives the subsequent studies are greatly needed because of the indisputable advantages of microsampling for young patients.








4. Other Volumetric Microsampling Methods

A few critical points should be reviewed to evaluate the usefulness of each microsampling method. First, the sampling process should be easy for patients without complicated steps. Secondly, the unit price of the device, as well as the accompanying costs of sampling, transport, storage, and analyses, should be profitable with its usefulness and clinical application. Finally, the analytical process should be compatible with typical diagnostics laboratories, including sample preparation, analytical method, and automatization [9,13].

Microsampling methods are divided into volumetric and nonvolumetric techniques. In TDM of immunosuppressants, the appropriate volume of select body fluid is critical for correct dosage adjustment and improvement of therapy from a long-term perspective. Generally, volumetric methods are a better choice for the TDM of narrow-therapeutic index drugs (NTIDs) because of the potential low variability of sample volume, better homogeneity, and sampling automatization. However, the usefulness of each device (regardless of type) should be checked according to the target population, analytes, type of matrix, laboratory proficiency, coordination reasons, and clinical outcome.

In the following sections, a short characteristic of the most popular microsampling methods, in contrast to the VAMS-Mitra™ device, is described. A summary of the selected microsampling methods is provided in Table 5.

Table 5. Selected alternative microsampling techniques summarise the characteristics and compare them with the reference venipuncture method [11,13,15,47–51].

Feature	Venipuncture	CMS	DBS	VAMS Mitra™	VAMS HemaPen™	qDBS Capitainer™	VAMS/qDBS hemaXis™
Type of matrix	whole blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood	capillary blood
Sampling	invasive (venipuncture)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)	noninvasive (fingerprick)
Sample self-collection	impossible	impossible	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)	possible (after training)
Sample volume	inaccurate (non-volumetric)	inaccurate (non-volumetric) or quantitative	inaccurate (non-volumetric)	quantitative (10, 20 or 30 µL) with RSD <4%	quantitative (2.74 µL)	quantitative (10 µL)	quantitative (10 µL)
Risk of sample contamination	possible (except vacuum and closed devices)	extremely high	high	high	extremely low	high	high
Visual control of blood loading	possible	possible	confined	possible	possible	possible (with control of sample volume)	possible (with control of sample volume)
Sample storage in RT	undesirable	undesirable	possible	possible, but with desiccant and in the dark	possible	possible, but with desiccant and in the dark	possible
Sample transportation	cold chain is required	cold chain is required	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions	except for special conditions
Shipping by post	impossible	impossible	possible	possible	possible	possible	possible
Visualization							

NVMS—nonvolumetric microsampling; qDBS—quantitative dried blood spot; VAMS—volumetric absorptive microsampling; DBS—dried blood spot; WB—whole blood collection with venipuncture. Visualisation was performed using [BioRender.com](https://www.biorender.com) under publishing rights.

4.1. Capillary Microsampling (CMS)

Using capillary microsampling (CMS), a small volume of whole blood was collected. Recently, the most popular devices are Drummond™ (Drummond Scientific Company, Broomall, PA) and Vitrex™ (Vitrex Medical A/S, Herlev, Denmark) capillary tubes. Both manufacturers produced several types of devices, namely glass or plastic capillaries, that were plain or coated with various anticoagulant agents, such as sodium, ammonium, lithium heparin, or EDTA. The blood is filled by capillary action into a narrow tube and may be closed by a wax on either side of the capillary. Generally, CMS is nonvolumetric; however, unique blood collection can be performed using special volume-calibrated tubes. Variable volumes of capillaries (0.5–100 µL) are available on the diagnostic market, and one of the manufacturers declared a $\pm 0.50\%$ accuracy bias and variability at 0.60–0.75% level [47,48].

Additionally, even blood samples should be stored in the same conditions as in the case of classic venipuncture samples, but on the other hand, DBS cards may be used to improve sample stability. Therefore, CMS tubes cannot be transported or delivered by mail at room temperature. Using CMS, sampling is easy but should be performed with medical

staff supervision. In contrast to dried blood techniques, the hematocrit effect on the sample volume and analyte recovery was insignificant. Automation of CMS sample analysis is particularly limited because of the difficulties associated with sample preparation. The fragility of tubes is a key factor responsible for their limited stability and the necessity for special conditions during transport. Capillary blood can be collected from the earlobe, forearm, heel, palm, fingertip, or arm; however, the fingerprick with a lancet is the most often used method for sample collection [11,47,48].

To date, no study has focused on CMS during the TDM of immunosuppressants.

4.2. Dried Blood Spots (DBS)

Mention in Section 1. DBS is the most well-known microsampling method developed in 1961 by Guthrie for screening investigations according to phenylketonuria in neonates [10,13,14]. The basis of the DBS technique is a cellulose paper card (the most popular is Whatman or Ahlstrom) with punch points, where the blood samples may be loaded by a capillary glass tube after the finger, toe, or heel prick. This technique is the best-known microsampling method for home-based self-sampling. The most difficult problems with DBS method validation are focused on recovery, matrix effect, process efficiency, volume effect, hematocrit effect, sample homogeneity, and volcano effect [10]. Cellulose cards (modified or non-modified) are used for DBS, such as Whatman 903, Ahlstrom 226, Whatman FTA, FTA Elute, DMPK-A, and DMPK-B. Complex matrices, such as whole blood, are complicated in the case of DBS, and chromatographic stratification on a cellulose card is often observed. As in the case of all microsampling devices, sample storage, delivery, and preparation are simplified. The extraction conditions and solvents used were similar to those used recently in methods based on VAMS. Generally, internal standards (ISs) are added to the DBS card incorporation before sampling and extraction. Other approaches imply that IS may be added to the blood matrix before spotting the card, directly with the extraction solvent, or before the sample cleaning up (purification). The ideal method is to incorporate a DBS card before sampling to reduce the matrix effect and increase analyte recovery maximally. Because of the small sample volume and relatively high dilution during extraction, more sensitive and selective methods should be used for DBS sample quantification [10,11,13,14].

DBS is the most popular microsampling method, and numerous analytical methods have been developed to determine immunosuppressants. Additionally, the IATDMCT guided DBS usage in the TDM of various NTIDs [10].

4.3. Capitainer™

The qDBS Capitainer™ microsampling device (Capitainer AB, Solna, Sweden) is a valuable tool based on the quantitative enabling of two fixed volumes of capillary blood simultaneously with the same sampler. This device contains two windows (ports) in common with two separate capillary channels, which obtained 18µL of blood volume and collected 10µL onto Ahlstrom 270 paper with a precision of <5%. As reported by Capitainer, the qDBS solution eliminates the overfilling risk and underfilling, and the color indication provides sampling success [50]. After sampling, the device is dried under ambient conditions for a minimum of two hours, after which drops are carefully removed and prepared for extraction. The validated operating temperature range oscillated between +15 °C and +35 °C, whereas the hematocrit range was established as 0.25–0.55. The other analytical steps were similar to those of other microsampling strategies. Exemplified errors according to Capitainer™ are presented in Figure 3. Similar to other microsampling devices, the sampling process may be performed by almost anyone. The quality of the sampler design directed for classic mail delivery allows for the preservation of satisfactory sample stability. When following the manufacturers' instructions: open, prick, apply, and post [51].

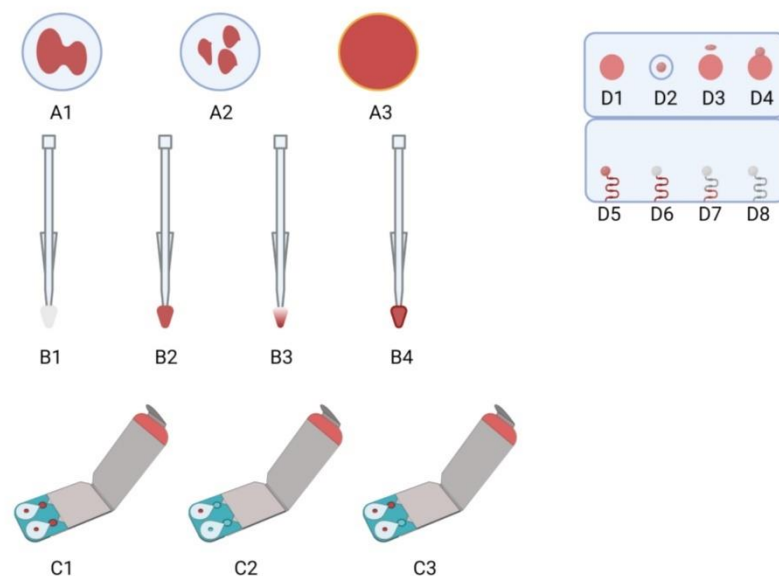


Figure 3. Comparison of typical problems during sampling for selected microsampling methods: (A) DBS, (B) VAMS—Mitra™, (C) qDBS—Capitainer™, and (D) HemaXis™. Issues description: (A1) layering; (A2) multiple blood applications; (A3) chromatographic effect (serum ring); (B1) blank VAMS sampler; (B2) correctly loaded VAMS sampler; (B3) unloaded VAMS sampler; (B4) overloaded VAMS sampler; (C1) correctly sampled qDBS; (C2) unloaded qDBS; (C3) correctly loaded and unloaded sampler windows (left and right, respectively); (D1,D3,D5) sample correctly loaded and punched; (D2,D4,D6,D7) unloaded blood sample and/or potential punch mistakes; (D8) an open capillary system for comparison purposes. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) under publishing rights.

Additionally, studies have reported no influence of the hematocrit level or lipids on sample quality. Velghe and Stove [49,50] tested the potential influence of the obtained blood drop and hematocrit levels on the final analyte concentration. This is the only study that has experimentally described the possibility of Capitainer-B using TDM to overcome the HCT effect and sample volume variability. No studies have focused on using this device to monitor immunosuppressant concentrations. In a pilot proficiency testing scheme, only one of participating laboratories use Capitainer-B™ as a device for blood collection during TAC, SIR, EVE, and CSA concentration monitoring [35].

4.4. HemaXis™

HemaXis™ is an innovative microsampling device based on the hybrid common DBS technique with volumetric microsampling, introduced by DBS System SA, Gland, Switzerland. This device's signature strengths are four DBS per device and high-quality 903 Protein Saver filter card grade (standard cassette format). The volume which may be obtained with one DBS oscillates in: $10.0 \pm 0.5\mu\text{L}$ (with a 95% confidence interval). The HemaXis™ blood collection was based on a fixed volume of blood obtained using a fingerprick [51]. After absorption, the sampler was covered, and the blood sample was directly transferred onto a cellulose filter card without additional manual steps or special equipment. However, the manufacturer described the high quality of sampling. Delahaye et al. pointed out that the HemaXis™ device is characterized by a relatively higher risk of external contamination. In pilot proficiency testing, only one laboratory performed TAC, EVE, and MPA determinations using the HemaXis™ device [51]. It is necessary to note that

using microsampling devices for MPA monitoring is problematic because it is essential to correlate drug exposure in whole blood and plasma levels. More precisely, MPA strongly binds into serum protein, and classic analytical methods are based on its determination in plasma. On the other hand, by microsampling devices, whole capillary blood is collected. Therefore, the mathematical correlation formula between results obtained from different matrices is strictly necessary in pharmacokinetic studies [35]. HemaXis™ DB is an FDA Class 1 medical device; therefore, it may be used only for development and research studies and not for medical diagnostics. Exemplified errors according to HemaXis™ are presented in Figure 3. To date, only the Zwart et al. study has focused partly on the HemaXis™ microsampling device [27].

4.5. HemaPen™

Trajan Scientific and Medical (Melbourne, VA, Australia) developed a semi-automated microsampling HemaPen™ device containing four capillaries with four paper discs. This system was coated with EDTA and absorbed a fixed blood volume of 2.74 µL of capillary blood in each case. The main advantage is that four HemaPen™ samples were collected from the same source (the 20 µL blood drop is recommended) [52]. As well as in the case of other microsampling devices, HemaPen™ seems to be an alternative strategy for minimalizing HCT and complex storage conditions limited. HemaPen™ is supplied for therapeutic or IVD use in Australia, New Zealand, the UK, the EU, and the USA [52]. This device is supplied outside the territories listed above for research purposes only, not for therapeutic or diagnostic use. To date, no study has reported on the use of this device for immunosuppressant monitoring. Recently, this device's main applications have focused on immunoglobulins and immunological biomarkers [9,52].

5. Application of Microsampling for Other Matrices Collecting

Microsampling is a universal collection technique of matrices other than whole (capillary) blood. As mentioned above, the best matrix for MPA determination is plasma, but in the case of Mitra™, the self-collection of plasma is the most difficult. DBS technique modifications, known as dry plasma spot (DPS) or dry saliva spot (DSS), are viable alternatives for achieving higher sample stability. However, the manufacturer and some studies declared that Mitra™ is ready to use in case of other matrices samplings, such as urine, saliva, and cerebrospinal fluid, but in the therapeutic drug monitoring of immunosuppressants, the matrices do not matter much [9,11,13].

6. Conclusions

Volumetric absorptive microsampling (VAMS) is an alternative tool for blood sampling, transport, and storage. It could be expected that for a broad spectrum of biochemical analyses, including TDM, VAMS successfully replaced the standard sampling venipuncture technique, omitting the blood collection facility, significantly reducing blood volume, and finally being much more friendly for the patient. Combining VAMS with LC-MS/MS seems to be a promising analytical method for pharmacokinetic analyses and TDM. Another innovative issue is using alternative tools for non-adherence monitoring, which is characteristic of pediatric transplant recipients. The VAMS chromatographic method for simultaneous monitoring of TAC and MPA, in common with biochemical parameters (e.g., creatinine and eGFR) and evaluation of adherence, may improve immunosuppressive therapy and consequently extend graft survival.

Finally, the unit price of one Mitra™ sampler is higher than that of the DBS card or venipuncture kit; however, microsampling has more advantages and benefits for future costs of life-long immunosuppressive therapy.

This technique is patient-friendly and simplifies clinical trials and drug monitoring. This provides a better experience for vulnerable patients, especially children. Following the manufacturers' instructions, blood collection can be performed anywhere, at any time, and by almost anyone. These techniques are becoming increasingly popular, with an

annual global growth rate, and the SARS-CoV-2 pandemic has increased the need for POP devices, including self-sampling devices [43]. The Theranos™ dire case showed how novel approaches for diagnostics are needed and demanded; however, they should be carefully and thoroughly examined and evaluated for clinical application. Microsampling techniques must become increasingly important in clinical trials and home-based monitoring of drugs, illnesses, or systemic organ functioning. In conclusion, we believe that microsampling devices are a chance to improve the quality of immunosuppressive therapy.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and T.P.; Writing—original draft preparation, A.K.; writing—review and editing, T.P. and A.K.; visualization, T.P. and A.K.; supervision, T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Special acknowledgements should be given to Paweł Czarnowski (Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw) for his help with the graphic designing of figures attached in this study and Katarzyna Bronicz (Warsaw School of Economics) for language support and remarks.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Seger, C.; Shipkova, M.; Christians, U.; Billaud, E.M.; Wang, P.; Holt, D.W.; Brunet, M.; Kunicki, P.K.; Pawiński, T.; Langman, L.J.; et al. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Ther. Drug Monit.* **2016**, *38*, 170–189. [CrossRef] [PubMed]
2. Bergan, S.; Brunet, M.; Hesselink, D.A.; Johnson-Davis, K.L.; Kunicki, P.K.; Lemaitre, F.; Marquet, P.; Molinaro, M.; Noceti, O.; Pattanaik, S.; et al. Personalized Therapy for Mycophenolate: Consensus Report by the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 150–200. [CrossRef] [PubMed]
3. Milone, M.C. Overview of the pharmacology and toxicology of immunosuppressant agents that require therapeutic drug monitoring. In *Personalized Immunosuppression in Transplantation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 1–27.
4. Dasgupta, A. Limitations of immunoassays used for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. In *Personalized Immunosuppression in Transplantation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 29–56.
5. Dasgupta, A. Monitoring free mycophenolic acid concentration: Is there any clinical advantage? In *Personalized Immunosuppression in Transplantation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 83–107.
6. Brunet, M.; Van Gelder, T.; Åsberg, A.; Haufroid, V.; Hesselink, D.A.; Langman, L.; Lemaitre, F.; Marquet, P.; Seger, C.; Shipkova, M.; et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 261–307. [CrossRef] [PubMed]
7. Kahan, B.D.; Keown, P.; Levy, G.A.; Johnston, A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin. Ther.* **2002**, *24*, 330–350. [CrossRef] [PubMed]
8. Shipkova, M.; Hesselink, D.A.; Holt, D.W.; Billaud, E.M.; van Gelder, T.; Kunicki, P.K.; Brunet, M.; Budde, K.; Barten, M.J.; De Simone, P.; et al. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus. *Ther. Drug Monit.* **2016**, *38*, 143–169. [CrossRef]
9. Delahaye, L.; Veenhof, H.; Koch, B.C.P.; Alffenaar, J.C.; Linden, R.; Stove, C. Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples: State-of-the-Art. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 310–321. [CrossRef]
10. Capiua, S.; Veenhof, H.; Koster, R.A.; Bergqvist, Y.; Boettcher, M.; Halmingh, O.; Keevil, B.G.; Koch, B.C.; Linden, R.; Pistos, C.; et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 409–430. [CrossRef]
11. Lei, B.U.W.; Prow, T.W. A review of microsampling techniques and their social impact. *Biomed. Microdevices* **2019**, *21*, 81. [CrossRef]
12. Spooner, N.; Anderson, K.D.; Siple, J.; Wickremsinhe, E.R.; Xu, Y.; Lee, M. Microsampling: Considerations for its use in pharmaceutical drug discovery and development. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1015–1038. [CrossRef]
13. Protti, M.; Mandrioli, R.; Mercolini, L. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1046*, 32–47. [CrossRef]
14. Denniff, P.; Spooner, N. Volumetric absorptive microsampling: A dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8489–8495. [CrossRef] [PubMed]
15. How to Collect a Microsample. Available online: <https://www.neoteryx.com/volumetrically-accurate-micro-sampling-vams-collection-devices?hsCtaTracking=369dbff8-4756-43aa-b4b8-80149a237d14%7Cb6bba9aa-da63-423c-b404-e6f2935e3852> (accessed on 25 November 2022).

16. Londhe, V.; Rajadhyaksha, M. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *182*, 113102. [[CrossRef](#)]
17. Abu-Rabie, P.; Neupane, B.; Spooner, N.; Rudge, J.; Denniff, P.; Mulla, H.; Pandya, H. Validation of methods for determining pediatric midazolam using wet whole blood and volumetric absorptive microsampling. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1737–1754. [[CrossRef](#)]
18. Kocur, A.; Marszałek, D.; Rubik, J.; Czajkowska, A.; Pawiński, T. Volumetric Absorptive Microsampling as a New Approach for Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus in Pediatric Renal Transplant Recipients: LC-MS/MS Method Development, Validation, and Clinical Application. *Pharmaceutics* **2022**, submitted/under review.
19. Vethe, N.T.; Gustavsen, M.T.; Midtvedt, K.; Lauritsen, M.E.; Andersen, A.M.; Åsberg, A.; Bergan, S. Tacrolimus Can Be Reliably Measured with Volumetric Absorptive Capillary Microsampling Throughout the Dose Interval in Renal Transplant Recipients. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 607–614. [[CrossRef](#)]
20. Kita, K.; Noritake, K.; Mano, Y. Application of a Volumetric Absorptive Microsampling Device to a Pharmacokinetic Study of Tacrolimus in Rats: Comparison with Wet Blood and Plasma. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2018**, *44*, 91–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kita, K.; Mano, Y. Application of volumetric absorptive microsampling device for quantification of tacrolimus in human blood as a model drug of high blood cell partition. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 168–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Koster, R.A.; Niemeijer, P.; Veenhof, H.; Hateren, K.V.; Alffenaar, J.C.; Touw, D.J. A volumetric absorptive microsampling LC-MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 495–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Paniagua-González, L.; Díaz-Louza, C.; Lendoiro, E.; Otero-Antón, E.; Cadarso-Suárez, C.; López-Rivadulla, M.; Cruz, A.; de-Castro-Ríos, A. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by LC-MS/MS using a novel atmospheric pressure ionization probe (UniSpray™). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113422. [[CrossRef](#)]
24. Ye, Z.; Gao, H. Evaluation of sample extraction methods for minimizing hematocrit effect on whole blood analysis with volumetric absorptive microsampling. *Bioanalysis* **2017**, *9*, 349–357. [[CrossRef](#)]
25. Capiou, S.; Stove, C. Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *190*, 113491. [[CrossRef](#)]
26. Grudzys, V.; Merrigan, S.D.; Johnson-Davis, K.L. Feasibility of Immunosuppressant Drug Monitoring by a Microsampling Device. *J. Appl. Lab. Med.* **2019**, *4*, 241–246. [[CrossRef](#)]
27. Zwart, T.C.; Metscher, E.; van der Boog, P.J.M.; Swen, J.J.; de Fijter, J.W.; Guchelaar, H.; de Vries, A.P.J.; Moes, D.J.A.R. Volumetric microsampling for simultaneous remote immunosuppressant and kidney function monitoring in outpatient kidney transplant recipients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *88*, 4854–4869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Veenhof, H.; Koster, R.A.; Junier, L.A.; Berger, S.P.; Bakker, S.J.; Touw, D.J. Volumetric absorptive microsampling and dried blood spot microsampling vs. conventional venous sampling for tacrolimus trough concentration monitoring. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 1687–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tron, C.; Ferrand-Sorre, M.-J.; Querzerho-Raguideau, J.; Chemouny, J.M.; Houssel-Debry, P.; Verdier, M.-C.; Bellissant, E.; Lemaître, F. Volumetric absorptive microsampling for the quantification of tacrolimus in capillary blood by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1165*, 122521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Scuderi, C.; Parker, S.; Jacks, M.; John, G.T.; McWhinney, B.; Ungerer, J.; Mallett, A.; Healy, H.; Roberts, J.; Staats, C. Finger-prick microsampling methods can replace venepuncture for simultaneous therapeutic drug monitoring of tacrolimus, mycophenolic acid, and prednisolone concentrations in adult kidney transplant patients. *Ther. Drug Monit.* **2022**. [[CrossRef](#)]
31. Mathew, B.S.; Mathew, S.K.; Aruldas, B.W.; Prabha, R.; Gangadharan, N.; David, V.G.; Varughese, S.; John, G.T. Analytical and clinical validation of dried blood spot and volumetric absorptive microsampling for measurement of tacrolimus and creatinine after renal transplantation. *Clin. Biochem.* **2022**, *105–106*, 25–34. [[CrossRef](#)]
32. Zwart, T.C.; Gokoel, S.R.; van der Boog, P.J.; de Fijter, J.W.; Kweekel, D.M.; Swen, J.J.; Guchelaar, H.-J.; Moes, D.J.A. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid in outpatient renal transplant recipients using a volumetric dried blood spot sampling device. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *84*, 2889–2902. [[CrossRef](#)]
33. Verheijen, R.; Thijssen, B.; Atrafi, F.; Schellens, J.; Rosing, H.; de Vries, N.; Beijnen, J.; Mathijssen, R.; Steeghs, N.; Huitema, A. Validation and clinical application of an LC-MS/MS method for the quantification of everolimus using volumetric absorptive microsampling. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1104*, 234–239. [[CrossRef](#)]
34. Yoo, S.; Kim, G.; Kim, S.; Ha, J.; Cho, B.S.; Joo, D.J.; Lee, J.I. Volumetric Absorptive Microsampling for the Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus in Patients who have Undergone Liver Transplant. *Ther. Drug Monit.* **2022**, ahead of print. [[CrossRef](#)]
35. Veenhof, H.; Koster, R.A.; Junier, L.A.; Zweipfenning, P.; Touw, D.J. Results from a proficiency testing pilot for immunosuppressant microsampling assays. *Ther. Drug Monit.* **2022**, ahead of print. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. van den Broek, I.; Qin, F.; Stuart, K.; Kowalski, M.P.; Millis, K.; Percy, A.; Holewinski, J.R.; Venkatraman, V.; yan Eyk, J.E. Application of volumetric absorptive microsampling for robust, high-throughput mass spectrometric quantification of circulating protein biomarkers. *Clin. Mass Spectrom.* **2017**, *4*, 25–33. [[CrossRef](#)]
37. De Geest, S.; Zullig, L.L.; Dunbar-Jacob, J.; Hughes, D.; Wilson, I.B.; Vrijens, B. Improving Medication Adherence Research Reporting: European Society for Patient Adherence, Compliance and Persistence Medication Adherence Reporting Guideline. *J. Cardiovasc. Nurs.* **2019**, *34*, 199–200. [[CrossRef](#)]

38. Blowey, D.L.; Hébert, D.; Arbus, G.S.; Pool, R.; Korus, M.; Koren, G. Compliance with cyclosporine in adolescent renal transplant recipients. *Pediatr. Nephrol.* **1997**, *11*, 547–551. [[CrossRef](#)]
39. Rianthavorn, P. Noncompliance with immunosuppressive medications in pediatric and adolescent patients receiving solid-organ transplants. *Transplantation* **2004**, *77*, 778–782. [[CrossRef](#)]
40. Christians, U.; Vinks, A.A.; Langman, L.J.; Clarke, W.; Wallemacq, P.; van Gelder, T.; Renjen, V.; Marquet, P.; Meyer, E.J. Impact of Laboratory Practices on Interlaboratory Variability in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*, 718–724. [[CrossRef](#)]
41. Microsampling—2 Years. Available online: <https://www.bioanalysis-zone.com/microsampling-2-years/> (accessed on 25 November 2022).
42. National Library of Medicine. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=volumetric+absorptive+microsampling&sort=jour&size=200> (accessed on 25 November 2022).
43. Rajadhyaksha, M.; Londhe, V. Microsampling: A role to play in COVID-19 diagnosis, surveillance, treatment and clinical trials. *Drug Test. Anal.* **2021**, *13*, 1238–1248. [[CrossRef](#)]
44. Gustavsen, M.T.; Midtvedt, K.; Vethe, N.T.; Robertsen, I.; Bergan, S.; Åsberg, A. Tacrolimus Area Under the Concentration Versus Time Curve Monitoring, Using Home-Based Volumetric Absorptive Capillary Microsampling. *Ther. Drug Monit.* **2020**, *42*, 407–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tron, C.; Lemaitre, F. Perspective on the Use of Limited Sampling Strategies to Assess Drug Exposure in the Era of Microsampling. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 812–813. [[CrossRef](#)]
46. Kindem, I.A.; Bjerre, A.; Åsberg, M.A.; Midtvedt, K.; Bergan, M.S.; Vethe, M.N.T. Tacrolimus measured in capillary volumetric microsamples in pediatric patients—a cross-validation study. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 371–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tang, R.; Yang, H.; Choi, J.R.; Gong, Y.; You, M.; Wen, T.; Li, A.; Li, X.; Xu, B.; Zhang, S.; et al. Capillary blood for point-of-care testing. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2017**, *54*, 294–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Wang, L.; Wang, B.; Chadwick, K.D.; Su, T.; Mangipudy, R.; Pillutla, R.C.; Qin, C.J. A practical workflow for capillary microsampling in nonclinical studies. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Velghe, S.; Stove, C.P. Evaluation of the Capitainer-B Microfluidic Device as a New Hematocrit-Independent Alternative for Dried Blood Spot Collection. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12893–12899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Capitainer Microsampling Device Manual. Available online: <https://capitainer.se/> (accessed on 25 November 2022).
51. Hemaxis Microsampling Device Manual. Available online: <https://hemaxis.com/> (accessed on 25 November 2022).
52. Trajan Microsampling Device Manual. Available online: <https://www.trajanscimed.com/pages/hemapen> (accessed on 25 November 2022).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

(2) Publikacja oryginalna – oznaczona jako **P₂** [IF=5,40; 140 pkt. MNiSW]
Kocur A*, Marszałek D, Rubik J, Czajkowska A, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics*. 2023; 15(1):299.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>



Article

Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application

Arkadiusz Kocur ^{1,*} , Dorota Marszałek ¹, Jacek Rubik ², Agnieszka Czajkowska ³ and Tomasz Pawiński ¹ ¹ Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland² Department of Nephrology, Kidney Transplantation and Arterial Hypertension, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland³ Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, Pharmacokinetics Laboratory, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

* Correspondence: arkadiusz.kocur@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-572-06-35

Abstract: Tacrolimus (TAC) is post-transplant pharmacotherapy's most widely used immunosuppressant. In routine clinical practice, frequent uncomfortable venipuncture is necessary for whole-blood (WB) collection to check trough TAC levels. Volumetric absorptive microsampling (VAMS) is an alternative strategy to WB collection. In this study, we aimed to validate and develop a liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for TAC quantification in WB and VAMS samples. After extraction with water and protein precipitation, the samples were directly analyzed using LC-MS/MS. Whole-blood and VAMS capillary-blood samples were collected from 50 patients treated with TAC during the follow-up visits. The cross-correlation between the developed methods was evaluated using Passing–Bablok regression and a Bland–Altman bias plot. The matrix effect (ME) and carry-over were insignificant for both scenarios. There was a high correlation between the processes and no significant clinical deviation. LC-MS/MS methods were successfully developed and validated in the 0.5–60 ng/mL calibration range. This study demonstrated and confirmed the utility of VAMS-based TAC monitoring in the pediatric population. This is the first study to directly develop and validate the VAMS LC-MS/MS method for evaluating the hematocrit effect in the pediatric population. The statistical correlation between immunochemical and VAMS-based methods was satisfactory.

Keywords: VAMS; tacrolimus; hematocrit effect; whole blood; kidney transplantation; pediatric population; LC-MS/MS; microsampling



Citation: Kocur, A.; Marszałek, D.; Rubik, J.; Czajkowska, A.; Pawiński, T. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 299. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010299>

Academic Editor: Dong Liang

Received: 13 December 2022

Revised: 9 January 2023

Accepted: 12 January 2023

Published: 16 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Transplantation is the best renal replacement therapy, particularly in end-stage renal disease (ESRD) patients. In this lifesaving procedure, an inefficient kidney is replaced by a perfectly healthy kidney from a living or deceased donor. The first successful pediatric renal transplant was performed in 1969 at Oregon University (Portland, OR, USA) by Goodwin, Mims, and Kaufman [1]. After transplantation, immunosuppressive therapy with drugs is necessary to prevent chronic and acute graft rejection [2].

Tacrolimus (TAC) is a calcineurin inhibitor (CNI) that constitutes the basis of post-transplant immunosuppressive pharmacotherapy in pediatric patients after solid organ transplantation (SOT), including kidney transplantation (KTX) [2]. Owing to the narrow therapeutic concentration range (NTID) and high inter- and intraindividual pharmacokinetic (PK) variability, blood TAC levels should be closely monitored to avoid under- or overdosing. Regular monitoring is necessary to balance the therapeutic range appropriately to ensure optimal graft survival [2–4]. Therapeutic drug monitoring (TDM) is essential for

the individualization and optimization of pharmacotherapy. Christians et al. estimated that 60% of all tests performed in TDM laboratories focus on TAC determination [5]. TAC can be determined using immunochemical assays (one of the most popular methods is chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)). A total of 53% of TDM laboratories currently monitor TAC concentrations using LC-MS/MS [3,5]. Whole blood is a suitable matrix for TAC determination owing to its extensive distribution (partition) into erythrocytes (red blood cells, RBC) [4].

So far, two internal standards were used for LC-MS/MS quantification of TAC: ascomycin (ASC) and deuterated TAC ($^{13}\text{C}_2\text{-TAC}$). However, using stable isotope-labeled internal standards (SIL-IS) is still recommended worldwide. However, in the case of TAC, its structural analog (ASC) seems to be an attractive alternative. Notably, using SIL-IS, the potential matrix effect (ME), especially in LC-MS/MS techniques based on electrospray ionization (ESI), should be satisfactorily compensated [4]. On the other hand, the better chemical purity of ASC, its relatively lower price, and its higher availability in the market are substantial advantages. Currently, 60% of TDM laboratories use ASC as an IS during daily TAC determinations [5,6]. This study validated the TAC determination reference method for whole blood according to both IS.

The trough concentration (C_0), also known as the concentration before the next dose of drug administration, is a routine parameter used in the therapeutic monitoring of TAC. The therapeutic range for TAC trough concentration (at steady state) is 5–20 ng/mL. The lower end of the range, especially in low-dose schemes, is decreased to 2–3 ng/mL and requires measurement of TAC concentrations starting from 2–3 ng/mL. Recently, it has been recommended to start with an induction dose of 100–150 mg/kg twice daily. This dose achieved C_0 between 10 and 20 ng/mL during the first months after transplantation and between 5 and 10 ng/mL in the subsequent therapy periods [2,3].

There is no doubt that during immunosuppressive therapy, frequent and high-volume blood sampling is necessary to determine the overall drug exposure and dose adjustment. Therefore, microsampling techniques such as nonvolumetric dry blood spot (DBS) and recently introduced volumetric absorptive microsampling (VAMS) are gaining importance in clinical practice. In this case, a low capillary-blood volume is required for finger puncture, which is assumed to be less than 30 μL . DBS sampling is very cheap and easy to perform by patients, but on the other hand, several characteristic constraints are being observed despite over 40 years of presence in TDM. Poor sample homogeneity and volume, hematocrit, and volcano effects are the predominant problems characteristic of DBS [7]. Volume variability and hematocrit influence may be reduced using alternative methods, such as VAMS.

The most popular tool, in this case, was the Mitra™ device introduced by Neoteryx LLC (Torrance, CA, USA) at the end of 2016. Other quantitative body fluid sampling tools are available in the diagnostic market: Capitainer (Capitainer; Solna, Sweden), hemaPen (Trajan Scientific and Medical; Ringwood, VI, Australia), and HemaXis (DBS System SA; Gland, Switzerland). These three devices are based on the DBS technique of quantitatively sampling the whole blood. Currently, VAMS is a state-of-the-art microsampling technique, particularly for the TDM. It is a high-precision volumetric technology called Mitra™ developed by Denniff and Spooner in 2014 [8].

The sampler tip is built using a hydrophilic porous polymer, which rapidly wicks biological fluids, such as whole blood, serum, urine, breast milk, cerebrospinal fluid, and saliva. The manufacturer proposed three tip volumes: 10 μL , 20 μL , and 30 μL [8,9]. The smallest sampler tips are commonly used for drug monitoring, particularly TDM. A reduction in the sample volume in TDM is only acceptable with LC-MS/MS analyte determination [10]. One lot of Mitra™ samplers was characterized by strict volume size, certified by the manufacturer, and in this study, the same series of samplers were used at an amount of 10.3 μL (<4% RSD of declared volume—10 μL). The VAMS tips absorbed capillary whole blood within a few seconds (2–4 s range) and dried rapidly at room temperature for 24 h. The drying process increases the stability of the sample and makes transport more accessible for logistical reasons. The tip may or may not be removed from

the handler before the extraction. Body fluids could be collected from a finger previously disinfected and punctured using a classic lancet. The collection process was easy to use as a fingerpick for measuring blood sugar levels. Similar to DBS, this simple technique is generally intended for patient self-home sampling, which is consistent with personalized therapy rules [7].

This study aimed to develop and validate an LC-MS/MS method for determining TAC in capillary-blood samples using a recently introduced microsampling technique called VAMS. During the investigation, the cross-correlations between the three methods were evaluated: the new capillary VAMS microsampling with LC-MS/MS (VAMS LC-MS/MS) for classic venous sampling (WB LC-MS/MS); and routinely used CMIA.

In our recently published review study, the currently developed methods for immunosuppressants determination (including TAC) in VAMS samples were prescribed [11]. Based on that, the main advantages of the VAMS LC-MS/MS method developed in that study are: the shortest time of sampler drying (1 h) and analytical run (5 min), simple extraction solvent (water), and finally, hematocrit evaluation and clinical cross-validation. Previously, only Kindem et al. performed a study using TAC LC-MS/MS determination in VAMS obtained from pediatric transplant recipients [12].

To the best of our knowledge, this is the first study in a pediatric population to evaluate the hematocrit effect (HE) according to VAMS and statistical cross-correlation between WB-LC-MS/MS, VAMS LC-MS/MS, and CMIA. Additionally, the low volume of VAMS tips used in this study, fast analytical performance, lack of hematocrit effect influence, and satisfactory accuracy of sample reanalysis seem to be strong points of study.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical Substances, Reagents, and Internal Standards

The tacrolimus reference standard powder (chemical purity $\geq 99.00\%$) was obtained from Astellas Pharma Inc. (Tokyo, Japan) and Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, Ontario, Canada). The internal standards, stable isotope-labeled deuterated tacrolimus- $^{13}\text{CD}_2\text{TAC}$ (88.00% chemical purity, 86.00% isotopic purity), and the structural analog, ascomycin (ASC) (chemical purity $\geq 98.00\%$), were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, ON, Canada) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectively. The differences in their chemical structures are shown in Figure 1. The following chromatographic solvents were used during the investigation: acetonitrile (hypergrade for LC) produced by Merck (Darmstadt, Germany) and methanol (supergradient for LC) obtained from POCH-Avantor Performance Materials (Gliwice, Poland). Additional reagents for the mobile phases, such as zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $>99.00\%$ chemical purity), ammonium fluoride ($>99.99\%$ chemical purity), and formic acid for LC-MS ($>99.99\%$ chemical purity), were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified and systematically obtained using a Simplicity 185 Millipore deionized system (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Pure LC-MS water was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The above reference and IS standards were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in a freezer to maintain appropriate stability. Other chemical substances and reagents, such as the liquids used for mobile phase preparation, analyte extraction, and protein precipitation, were stored at room temperature or $4\text{ }^\circ\text{C}$ when prepared in the experimental mixtures. To prepare calibration curves, human whole blood (WB) was freshly obtained from healthy volunteers (without TAC and other active substances influencing TAC concentration). Method validation was obtained from the Regional Centre of Blood Donation and Hemotherapy (Warsaw, Poland). Blood was stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$ and used to prepare calibration curves for one week.

The VAMS-MitraTM 10 μL samplers for capillary-blood sampling and 96-samples autotrack for sampler drying and storage cartridges were purchased from Neoteryx (Torrance, CA, USA). Vacutainer test tubes (4 mL) containing $\text{K}_2\text{-EDTA}$ (dipotassium salt of ethylenediamine tetra-acetic acid) as an anticoagulant for whole-blood collection, lancets, and blood collection sets were obtained from Becton Dickinson (Warsaw, Poland). Simple laboratory

materials, pipettes, tips, and test tubes were purchased from Eppendorf (Hamburg, Germany). Vials with an integrated 300 μ L insert and complementary caps were obtained from ThermoScientific (Waltham, MA, USA).

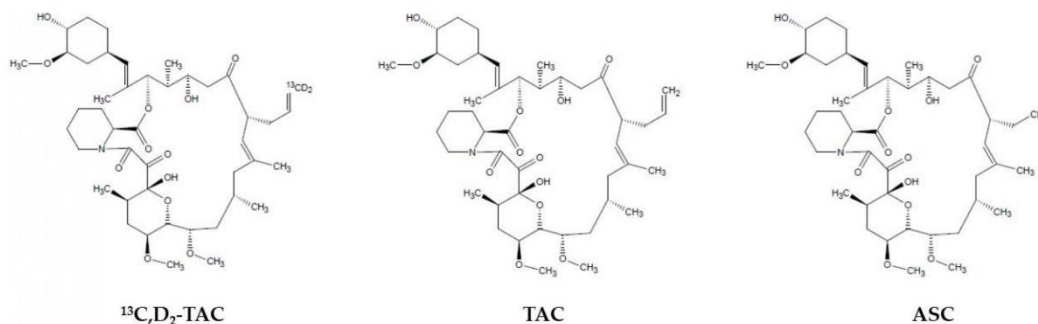


Figure 1. Chemical structures of the reference standard (tacrolimus, TAC) and internal standards (deuterated TAC, $^{13}\text{CD}_2\text{TAC}$, and ascomycin, ASC).

2.2. Working Solutions, Calibrators (CS), and Quality Control (QC) Samples Preparation

Individual working solutions (primary stock solutions) were prepared for TAC (100 ng/mL and 1000 ng/mL), $^{13}\text{CD}_2\text{-TAC}$ (1000 ng/mL), and ASC (200 ng/mL) in a methanol/water mixture (TAC; 50:50, *v/v*) or pure methanol (both IS) from the solid substances mentioned in Section 2.1. Working solutions of IS were diluted, such as to the concentration of $^{13}\text{CD}_2\text{-TAC}$ and ASC in the final sample at 15 ng/mL level. Another working solution with a lower concentration (i.e., the next stage of the working solution) was prepared by diluting the primary stock solution with a methanol/water mixture. Finally, seven working solutions were obtained for the calibration curve construction, corresponding to the appropriate calibrator concentrations: 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 30.0, and 60.0 ng/mL. These calibration standards (CS) were prepared by spiking whole blood (WB) without TAC, obtained from healthy volunteers, by adding 10 μ L of working solution to 50 μ L of WB and immediately mixing using a self-automatic vortex (Chemland, Stargard, Poland) at room temperature. The prepared calibrators were either utilized in the WB-LC-MS/MS method or loaded into the VAMS and dried for at least one hour. Quality controls (QC) were prepared in the same manner and at four different concentrations: lower –0.75 ng/mL (LQC), medium –7.5 ng/mL (MQC₁), 25 ng/mL (MQC₂), and high –50 ng/mL (HQC). Complete working solutions were stored at –20 °C conditions. CS and QC samples were prepared *ex tempore* by spiking blood (from healthy volunteers) with TAC and IS solutions, and the remainder was discarded.

2.3. Patients' Samples and Protocol of Sampling

Whole-blood (classic venous collection) and VAMS samples (finger puncture by a lancet) for this study were obtained during regular follow-up visits between April 2022 and October 2022 from 50 pediatric renal transplant recipients treated at the Children's Memorial Health Institute (CMHI) in Warsaw. Post-transplant pharmacotherapeutic regimens included Advagraf[®] and Prograf[®] (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) as once- or twice-daily TAC formulations, respectively. Additionally, patients received mycophenolic acid (MPA) CellCept[®] (Roche AG, Basel, Switzerland) and corticosteroid drugs. Detailed demographic and clinical information about the participants is provided in Section 2.5. WB and VAMS samples were collected before the first daily TAC dose for trough concentration measurement (predose concentration). After sampling, the blood samples were stored at –20 °C, but the VAMS samplers loaded with capillary blood were stored at room temperature (RT). Samples were prepared in the next analytical step no more than a week after sampling. All the participants (or their legal guardians) provided informed consent before the study was conducted. This study was conducted in accordance with the Declaration

of Helsinki, Council for International Organizations of Medical Sciences Guidelines, and Good Clinical Practice (GCP). The project was approved by the Bioethics Committee of the Children's Memorial Health Institute in Warsaw (approval number and date: 17/KBE/2022 (20 April 2022)). Part of this study was funded by a Medical University of Warsaw "Young Researcher" grant (FW22/1/F/MB/N/22).

2.4. Whole-Blood Samples Treatment and Preparation for Method Validation

WB samples (total volume: 4 mL) were divided into two parts: 2 mL for routine TAC-CMIA quantification in the CMHI Pharmacokinetics Laboratory and 2 mL of WB for reference TAC quantification using the LC-MS/MS system in the Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw. Simultaneously, the medical doctor collected capillary-blood samples during the follow-up visit using a VAMS Mitra™ sampling device. Samples for routine CMIA analyses were prepared using commercial kits (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA) in a hospital medical laboratory using established proficiency-testing protocols. More information about this method is provided in Section 2.9. Samples for LC-MS/MS were prepared using the second part of the WB. In this case, 50 µL of WB was diluted with 90 µL of pure water, and 10 µL of internal standard (ASC or ¹³CD₂-TAC) was added (simultaneously, the validation on two different IS was prepared; results can be found in Section 3). The remaining blood was stored at −20 °C. For sample purification, 400 µL of the precipitation mixture (zinc sulfate (0.1 mol/L) and acetonitrile solution, 50:50 (v/v)), were uploaded into a plastic 1.5 mL tube with the sample. Subsequently, the samples were shaken for 10 min at RT using a ThermoScientific thermoblock (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and inserted into a fixed-rotor MPW-375 centrifuge at 3500 rpm at 4 °C temperature conditions for 10 min. The obtained supernatant (250 µL) was transferred into glass vials and subjected to LC-MS/MS assay under the conditions detailed in Section 2.6. The complete method protocol is presented in the Figshare dataset [13,14].

2.5. VAMS Samples Treatment and Preparation for Method Validation

The VAMS samples for LC-MS/MS assays were dried for a minimum of 1 h in an autorack or the manufacturer's original cartridges and stored in the dark at 4 °C. Subsequently, each Mitra™ sampler was placed in a plastic test tube in 150 µL of pure deionized water. Next, to extract analytes from the VAMS tips, the samples were shaken using a shaking thermoblock (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) at RT for 1 h at a frequency of 1000 rpm. In the next step, 10 µL of IS ASC was added (after evaluation of the WB-LC-MS/MS method and the worst results of analyses with ¹³CD₂-TAC, the authors developed and validated the VAMS method using ASC as the IS only (more details in Section 3)). A total of 150 µL precipitation mixture containing zinc sulfate (0.1 mol/L) and acetonitrile (50:50, v/v) was also added to the test tube. The samples were shaken for 10 min at room temperature using the above thermoblock. Finally, the samples were placed in a fixed-rotor MPW-375 centrifuge at 3500 rpm and 4 °C for 10 min. The obtained supernatant (250 µL) was transferred into glass vials and subjected to LC-MS/MS assay under the conditions detailed in Section 2.6. The full method protocol is presented in the Figshare dataset [13,14].

2.6. HPLC-MS/MS Equipment and Apparatus Conditions

The LC-MS/MS system used for sample analysis consisted of an 8050 triple-quadrupole MS detector (Shimadzu, Tokyo, Japan) and a set of devices for liquid chromatography. The Nexera X2 LC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) and auxiliary equipment, namely, a binary pump for gradient flow (30AD), degasser unit (DGU-20A5R), thermostatic autosampler with vial racks (SIL-30AC), and thermostatic column oven (CTO-20AC), were coupled with the MS detector. The stationary phase was a Hypurity-C₁₈ (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) chromatographic column (50 × 2.10 mm, 3 µm) with a complementary holder with a guarded drop-in precolumn (10 × 2.10 mm, 3 µm) (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). During the analyses, the oven temperature was set at 40 °C for the column thermostat. Additionally, a rotary six-position valve (FCV-20AH) was used to select the

line between the LC system and the MS detector. The binary pump was set on the gradient flow of the mobile phase, which contained a mixture of two solutions: A and B (aqueous and organic phases, respectively). Solution A consisted of pure deionized water with an ammonium fluoride solution (final concentration in the phase was set at 2 mmol/L) supplemented with MS-purity formic acid (final concentration in the phase was set at 0.05%). Solution B consisted of an acetonitrile/methanol mixture (50:50, *v/v*), with the same final concentrations of ammonium fluoride and formic acid. Gradient elution during analysis in a reversed-phase chromatographic system (RP-HPLC) was set on the following 5-min LC-program schedule:

- (1) Between sample injection and 0.2 min—a total volume of 90% phase A and 10% phase B;
- (2) Between 1.00 and 3.10 min—a total volume of 5% of phase A and 95% of phase B;
- (3) The last 2 min of a single run is the same volume proportion as the 1st stage.

The summary gradient flow was set at 0.75 mL/min during the 5 min LC program. LabSolutions software was used for multiple pair monitoring (MRM) and ion source optimization. The ammonium adducts $[M+NH_4]^+$ were observed in positive-ion mode with electrospray ionization (ESI+). The main parameters of the MS detector used in the assays are listed in Table 1. The retention time was observed at 1.50 min after sample injection for each analyte (TAC, ASC, $^{13}C, D_2$ -TAC). The autosampler cooler was set at 5 °C, and the samples were injected from the vials into the MS detector at a speed of 5.00 μ L/sec. Only the first MRM transition was used for each analyte during the validation and calculation of the concentrations in patient samples. MRM pairs (*m/z*) were set as follows (quantitative and control pairs):

- (1) TAC: 821.20 \rightarrow 768.40 and 821.20 \rightarrow 786.40;
- (2) $^{13}CD_2$ -TAC: 824.56 \rightarrow 771.50 and 824.56 \rightarrow 789.50;
- (3) ASC: 809.20 \rightarrow 756.55 and 809.20 \rightarrow 564.35.

Table 1. The MS instrument parameters were set during the analysis.

Parameter	Value
electrospray voltage	0.70 kV
detector voltage	1.82 kV
dwel time	13.0 ms
single event time	0.048 s
collision energy	22 V *
temperature of interface	250 °C
desolvation temperature	526 °C
temperature of DL ¹	200 °C
temperature of HB ²	250 °C
drying gas (nitrogen) flow	5.0 L/min
heating gas (air) flow	10.0 L/min
nebulizing gas (nitrogen) flow	1.0 L/min
CID gas (argon) pressure ³	270 kPa
thermostatic temperature	40 °C

* Set for tacrolimus (TAC), ascomycin (ASC), and deuterated tacrolimus ($^{13}C, D_2$ -TAC). ¹ DL: desolvation line, ² HB: heat block, ³ CID: collision-induced dissociation.

The injection volumes of the WB and VAMS samples were set to 1 μ L and 10 μ L, respectively. The other apparatus parameters and chromatographic conditions were identical for VAMS and WB assays using LC-MS/MS. Full details of the LC-MS/MS conditions are presented in the Figshare dataset [14].

2.7. Method Validation

The validation is necessary for every recently developed bioanalytical method to demonstrate its reliability and potential utility even before the first assay of patient samples. In that study, two methods were validated and evaluated: reference LC-MS/MS meth-

ods using whole blood (WB) obtained by venipuncture for two internal standards, ASC and $^{13}\text{C}_2\text{D}_2\text{-TAC}$, and LC-MS/MS methods based on samples collected by VAMS. EMA guidelines recommend using a stable isotope-labeled IS whenever its isotopic purity is relatively satisfactory. Based on our experience with TAC assays, we used two IS to provide the preferred one because of their better validation parameters [14,15]. To appropriate the validation process, characteristics of each method according to parameters, such as selectivity; lower limit of quantification (LLOQ); and calibration range with linearity response, accuracy, precision, matrix effect, and analyte stability testing under different conditions, are needed. Analytical validation in the case of that study was performed according to the EMA guidelines [15].

2.7.1. Selectivity

During the preparation of each calibrator set for the calibration curve preparation, the selectivity of each method was individually determined using blank samples without TAC from six different sources. VAMS and whole-blood samples were prepared by spiking the matrix with the LLOQ concentration of TAC (0.5 ng/mL). For both sample sets (blank and spiked), the EMA acceptance criterion was an interference response of less than 20% of the LLOQ for TAC and less than 5% for the IS used in each TAC determination method. Two events evaluated the interference from endogenous and unknown substances according to the quantitative and control MRM pairs in the TAC and IS retention time windows. Blank and zero samples were simultaneously prepared to select the calibration run. Blank samples ($n = 6$) were prepared without IS and TAC to analyze the reactions during the entire chromatographic run. Zero samples ($n = 6$) were prepared without TAC calibrators but with IS, in addition to checking for chromatographic interference caused by IS (significant for standards with limited chemical purity, i.e., deuterated TAC).

2.7.2. Carry-Over Effect

Carry-over was experimentally performed using the sequence of the HQC sample injection immediately after the blank sample without analytes. Following the EMA guidelines, the acceptance criteria for TAC are less than 20% and less than 5% for IS.

2.7.3. Calibration and Linearity

These parameters were evaluated and calculated in the range of 0.5 and 60 ng/mL based on seven concentration levels: 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 30.0, and 60.0 ng/mL. The results from 10 calibration curves prepared on different days were used for linearity evaluation and calibration. In this study, linearity was verified using linear regression for $1/x$ weighting.

2.7.4. Accuracy and Precision

Accuracy is a validation parameter that defines the closeness of agreement between the determined concentration value and the accepted reference concentration value. This procedure should be performed using calibrators for the known analyte concentrations. Mathematically, the accuracy is expressed as the determined value/reference value percentage ratio. Precision is expressed as the degree of scattering between series samples and is defined as the percentage SD/arithmetical mean ratio. Both parameters should be evaluated within a run (also known as intraday) and between runs (also known as interday). Both parameters were calculated using the results of sample analyses at five concentration levels (LLOQ, MQC₁, MQC₂, HQC, and ULOQ) in a single run ($n = 10$; within-run) or different runs ($n = 10$; between-run). Acceptance values for accuracy and precision: the mean concentration should be within 15% of the reference value, whereas the LLOQ should be within 20% of the reference value.

2.7.5. Autosampler Stability

The autosampler stability parameter was determined using four TAC concentrations, similar to the IS used in previously described methods. Samples were analyzed immediately

after the preparation protocol was performed, and after 1, 3, and 5 days of storage in an autosampler rack, they were cooled at 5 °C.

2.7.6. Short-Term Stability

The short-term stability was evaluated by a postpreparation experiment with a protocol interrupting TAC concentrations of −7.5 and 25 ng/mL for each method. Whole-blood (TAC spiked with $^{13}\text{C}_2\text{D}_2\text{-TAC}$ or ASC) or VAMS samples (spiked with ASC) were analyzed immediately after preparation. Similarly, the following two sets of samples for each technique were prepared and stored before and after protein precipitation at 2 h and 4 h intervals at ambient room temperature. All the procedures were repeated six times for each TAC determination method.

2.7.7. Working Solution and Samples Long-Term Stability

The results of the working-solution stability examination were reported in a previous study by Bodnar-Broniarczyk et al. [16,17]. For TAC LC-MS/MS assays in our laboratory, we used the same working solution as the reference standards and ITSD, for which the long-term stability tests are described above. Therefore, we abandoned the long-term stability tests for working solutions.

The long-term stability of the analyzed samples was not assessed because of the specificity of therapeutic drug monitoring. TAC determination in patient samples was needed only at the time of sample collection, and the samples were not examined after long-term storage.

2.7.8. Matrix Effect

To evaluate the matrix effect (ME) as a significant problem during ESI-MS assays, a postextraction addition experiment was performed for four concentration levels of TAC, similar to the IS. Six different whole-blood samples were collected from patients not treated with TAC to determine the ME quantitatively. The experiment was conducted under established apparatus conditions using samples of reference calibrator solutions, and whole-blood samples were treated according to the postextraction determination rules. The matrix effect (ME), process efficacy (PE), and absolute recovery (AR) ratios (expressed as percentages) were calculated according to Taylor and Zhou et al. studies regarding the EMA acceptance range for ME evaluation [15,18,19]. ME, PE, and AR were calculated separately for each described method, including IS ($^{13}\text{C}_2\text{D}_2\text{-TAC}$ and ASC) using the WB method and ASC only for the VAMS method.

2.7.9. Incurred Sample Reanalysis (ISR)

The incurred sample reanalysis is recommended for potential analytical differences evaluation between calibrators and samples. These differences may be caused by comedication, sample inhomogeneity, or known or unknown metabolites [15]. This validation test should be performed in separate analytical runs, on different days, for 10% of samples in case of small molecules analysis and confirmed with initial quantification result for each sample included in ISR [15]. In the case of that study, the ISR experiment was repeated twice for VAMS-LC-MS/MS and WB-LC-MS/MS methods, using ten samples obtained from patients.

2.8. Statistical Analysis and Results Evaluation

LabSolutions software (version 5.98, Shimadzu, Tokyo, Japan) was used for chromatogram treatment, analyte and IS peak marking and counting, and fitting of calibration curves by $1/x$ weighting (linear regression line using the least-squares method to establish the best standard concentration-detector signal), calculating the calibration equation and correlation coefficient of calibration curves (R^2), and concentration and chromatographic signal-to-noise (S/N) determination. MedCalc software (version 20.11, MedCalc, Ostend, Belgium), Statistica (version 12.5, StatSoft Inc., Kraków, Poland), and MS Excel

(version 13.65, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) were used to evaluate the results, including validation of the methods and statistical correlation between the method results (Passing–Bablok regression, bias estimation with the Bland–Altman procedure, and Pearson’s correlation coefficient calculation). In this study, the data are presented as arithmetic mean \pm standard deviation (SD), and the coefficient of variation (CV) is presented as a percentage SD/arithmetic mean ratio.

2.9. CMIA Method Details

In CMHI, as a routine method for TAC trough concentration monitoring (established range 2–30 ng/mL) in whole blood, chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) was used with a commercially available, ready-to-use kit named Alinity™ (Abbott, Chicago, IL, USA). This test is a delayed one-step immunoassay for quantitatively determining immunosuppressants in human whole blood using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology. All samples (control and patient) were prepared manually using a precipitation reagent and centrifuged. The supernatant was decanted into tubes and placed into an Alinity *i* system. The reagents (assay diluent, antitacrolimus-coated paramagnetic microparticles, and acridinium–tacrolimus tracer) were combined to create a reaction mixture—the drug in the patient’s sample is bound to the antibodies on the microparticles. The resulting chemiluminescence reaction was measured in relative light units (RLUs). An indirect relationship existed between the amount of tacrolimus in the sample and the RLUs detected by Alinity *i* System optics. As this method is routinely used in clinical laboratories at the CMHI, validation and quality control were not performed in our study. The CMIA method has minimal metabolite implications compared with other immunochemical methods (IAs). Only metabolite II (31-O-desmethyl-TAC) and metabolite III (15-O-desmethyl-TAC) interacted in the CMIA assay. It is responsible for 15% and 3% of the parent TAC [20]. Consequently, IAs, including CMIA, could overestimate the measured TAC concentration because of their cross-reactivity with the above metabolites. More information about the reagents, sample preparation, analytical implications, and proficiency testing can be found in the CMIA Alinity Guide [21].

3. Results

3.1. Development of the Whole-Blood Method of TAC Quantification

TAC determination in whole-blood samples was performed using an LC-MS/MS system with ASC and $^{13}\text{C}_2\text{-D}_2\text{-TAC}$ as the IS. Analytical conditions were established experimentally based on the chromatographic separation data from the obtained chromatograms. The total binary flow rate was set to 0.75 mL/min, and the mobile phase was mixed in a gradient during the analytical run, consisting of water and acetonitrile/methanol mixtures with ammonium fluoride and formic acid. The oven temperature was set to 40 °C for the thermostatic chromatographic column, and the utility of the $\text{C}_{18}\text{-HyPurity}$ column as a stationary phase was also confirmed. The LC run time program, coupled with the MS detector, was set to 5 min. For each analyte (IS and TAC), the retention time was observed 1.5 min after sample injection. The experimental MS parameters were set using the LabSolutions software (Shimadzu, Tokyo, Japan). A short protocol of the above method and a description of the LC-MS/MS parameters can be found in Figshare files [13,14].

3.2. Validation of Whole-Blood Method of TAC Quantification

The LC-MS/MS method, based on whole-blood samples, was successfully validated in the TAC concentration range of 0.5–60 ng/mL for both the used IS: ASC and $^{13}\text{C}_2\text{-D}_2\text{-TAC}$.

The calibration model (weighted $1/x$), summarized as the mean of the R^2 of the 10 calibration curves for each IS, was 0.993 ($y = 0.035x + 0.009$) and 0.988 ($y = 0.027x + 0.025$) for ASC and $^{13}\text{C}_2\text{-D}_2\text{-TAC}$, respectively. Each calibration curve consisted of seven increasing concentration levels, and the blank and zero samples were used for selectivity testing. The zero samples were prepared without TAC spiking, whereas the blank sample lacked TAC and IS addition. Both test samples were prepared by WB and subjected to all analytical

protocols. The chromatographic signals of unknown or endogenous substances were lower than 15% of the lower limit of quantification (LLOQ) concentration (0.5 ng/mL), demonstrating good selectivity of the method. The lower limit of quantification (LLOQ) was set experimentally at 0.5 ng/mL based on chromatogram observations and signal-to-noise ratio (S/N) calculation for both IS.

The accuracy and precision parameters of TAC concentrations at the LLOQ, MQC₁, MQC₂, and HQC were within the European Medicines Agency (EMA) acceptance ranges (accuracy within 85–115%, precision less than 15%, and less than 20% for LLOQ) [15]. These parameters were calculated according to ten intrarun and between-run TAC measurements (Table 2).

The stability test (six replicates; four time points: initial day 0, day 1, day 3, and day 5, for both IS) during storage at 5 °C in an autosampler confirmed the satisfactory stability of the analytes in the samples (Table 3). The stability values of TAC concentrations in samples at room temperature during the stop-work procedure were also satisfactory for MQC₁ and MQC₂ concentrations of TAC (7.50 and 25 ng/mL, respectively). The mean stability levels set at two hours before and after extraction were calculated and are summarized in Table 4. Both IS stability values were within the EMA acceptance range for analyte stability [15].

Matrix effects were evaluated in the pre- and postextraction experiments. In addition, the absolute recovery (AR, %) and process efficiency (PE, %) were calculated for TAC, ASC, ¹³C₂-TAC, and TAC/IS peak area ratios (Table 5). According to EMA guidelines, the ratio values are within an acceptable range [15].

Based on the above results, for the novel method of TAC concentration measurement in VAMS samples, ASC was chosen as a prominent IS for method development and validation because of its better results compared to ¹³C₂-TAC.

TAC determination in capillary-blood samples obtained using VAMS samplers was performed using an LC-MS/MS system with ASC as the IS. The optimal drying time for VAMS after sampling or before calibration curve preparation was experimentally set to 1 h. The same precipitation mixture (zinc sulfate: acetonitrile) was used for the VAMS sample preparation. The volume of water added for blood extraction from the sampler tip was also set experimentally. It was concluded that 150 µL of pure water was sufficient to extract analytes effectively. Analytical conditions were established experimentally based on chromatographic separation data from chromatograms obtained using a previously developed WB-LC-MS/MS method. The total binary flow, mobile phase ingredients, and oven temperature were the same as in Section 2. The utility of the C₁₈-HyPurity column as a stationary phase was also confirmed. The LC run time program and MS detector were set at 5 min. For each analyte (IS and TAC), the retention time was also observed as 1.5 min after sample injection. The MS parameters were set experimentally using a previously described WB-LC-MS/MS method.

Representative chromatograms of LLOQ and HQC are shown in Figure 2. The sample preparation protocol and LC-MS/MS assay details are presented in the Figshare file [14].

Table 2. Results of intrarun and between-run accuracy and precision examination ($n = 10$).

Parameter	LLOQ—0.50 ng/mL		MQC ₁ —7.50 ng/mL		MQC ₂ —25.00 ng/mL		HQC—60.00 ng/mL	
	WB-ASC	WB-dTAC	VAMS-ASC	WB-ASC	WB-ASC	WB-dTAC	VAMS-ASC	WB-ASC
C _{TAC} (ng/mL)	0.45 ± 0.06	0.53 ± 0.08	0.52 ± 0.04	7.33 ± 0.36	7.36 ± 0.62	7.42 ± 0.28	25.48 ± 1.02	25.80 ± 1.81
Accuracy (%)	90.42	105.90	103.96	97.71	98.12	98.87	101.91	103.21
Precision (%)	12.07	15.79	8.43	4.96	8.45	3.83	4.00	7.03
Intrarun Accuracy and precision ($n = 10$)								
C _{TAC} (ng/mL)	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.56 ± 0.03	7.60 ± 0.35	7.45 ± 0.29	7.37 ± 0.19	24.73 ± 1.70	23.95 ± 1.36
Accuracy (%)	101.22	98.39	111.62	101.33	99.18	98.24	98.90	95.82
Precision (%)	3.66	6.84	5.77	4.58	3.91	2.60	6.88	5.71
Between-run Accuracy and precision ($n = 10$)								
C _{TAC} (ng/mL)	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.56 ± 0.03	7.60 ± 0.35	7.45 ± 0.29	7.37 ± 0.19	24.73 ± 1.70	23.95 ± 1.36
Accuracy (%)	101.22	98.39	111.62	101.33	99.18	98.24	98.90	95.82
Precision (%)	3.66	6.84	5.77	4.58	3.91	2.60	6.88	5.71

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD; with min/max range); WB-ASC, whole-blood method with ascomycin as internal standard; WB-dTAC, whole-blood method with deuterated tacrolimus as internal standard; VAMS-ASC, VAMS method with ascomycin as internal standard.

Table 3. Autosampler stability of LC-MS/MS methods using WB samples.

The CONCENTRATION of TAC (ng/mL)	Calculated Concentration * (ng/mL) and Stability (%)	
	Initial Day	after 24 h
LLOQ (0.50) MQC ₁ (7.50) MQC ₂ (25.0) HQC (60.0)	0.56 ± 0.10; 100.00	0.51 ± 0.06; 89.91
	7.65 ± 0.98; 100.00	7.51 ± 0.75; 98.22
	25.86 ± 2.31; 100.00	25.33 ± 1.54; 97.95
	61.49 ± 2.50; 100.00	60.11 ± 6.95; 97.76
IS: dTAC ($n = 6$)		
LLOQ (0.50) MQC ₁ (7.50) MQC ₂ (25.0) HQC (60.0)	0.50 ± 0.06; 100.00	0.49 ± 0.06; 99.45
	7.36 ± 0.33; 100.00	7.51 ± 0.75; 99.52
	23.83 ± 0.66; 100.00	23.43 ± 0.92; 98.32
	62.43 ± 2.56; 100.00	60.88 ± 2.30; 97.53
IS: ASC ($n = 6$)		
LLOQ (0.50) MQC ₁ (7.50) MQC ₂ (25.0) HQC (60.0)	0.46 ± 0.24; 80.83	0.46 ± 0.35; 70.44
	7.33 ± 0.66; 95.85	7.02 ± 0.49; 91.89
	25.17 ± 2.88; 97.31	24.96 ± 2.27; 96.52
	58.94 ± 4.36; 95.86	55.22 ± 4.98; 89.80
IS: dTAC ($n = 6$)		
LLOQ (0.50) MQC ₁ (7.50) MQC ₂ (25.0) HQC (60.0)	0.45 ± 0.10; 90.32	0.44 ± 0.05; 89.08
	7.21 ± 0.35; 98.03	6.79 ± 0.27; 92.23
	22.30 ± 0.93; 93.58	21.51 ± 0.78; 90.26
	59.85 ± 2.11; 95.87	58.27 ± 2.65; 93.34
IS: ASC ($n = 6$)		

* Data are expressed as the mean concentration ± SD; IS: internal standard; dTAC, deuterated tacrolimus; ASC, ascomycin.

Table 4. Stop work test summary for all WB and VAMS LC-MS/MS methods. (*n* = 6).

TAC Concentration [ng/mL]	Calculated Concentration * (ng/mL) and Stability in RT (%)											
	WB-ASC (<i>n</i> = 6)			WB-dTAC (<i>n</i> = 6)			VAMS-ASC (<i>n</i> = 6)					
	0 h	+2 h	-2 h	0 h	+2 h	-2 h	0 h	+2 h	-2 h	0 h	+2 h	-2 h
MQC ₁ (7.50)	7.48 ± 0.22 100.00%	7.38 ± 0.28 98.39%	7.10 ± 0.53 94.53%	7.54 ± 0.93 100.00%	7.65 ± 1.92 101.94%	7.40 ± 0.66 98.67%	7.53 ± 0.21 100.00%	7.17 ± 0.62 94.21%	7.65 ± 0.23 103.04%			
MQC ₂ (25.0)	24.79 ± 0.71 100.00%	23.00 ± 1.27 92.00%	23.02 ± 1.97 92.84%	25.06 ± 1.54 100.00%	25.44 ± 2.88 101.75%	22.14 ± 2.78 88.54%	25.50 ± 0.24 100.00%	25.37 ± 0.65 100.38%	25.32 ± 0.93 100.79%			

* Data are expressed as mean ± SD (with min./max range); RT, room temperature (-24 °C). WB-ASC, whole-blood method with ascomycin as internal standard; WB-dTAC, whole-blood method with deuterated tacrolimus as internal standard; VAMS-ASC, VAMS method with ascomycin as internal standard.

Table 5. Results of matrix effect, process efficiency, and absolute recovery examinations (*n* = 6).

Parameter	Low QC—0.50			MQC—7.50			MQC—25.00			HQC—60.00		
	TAC	F	ASC	TAC	F	ASC	TAC	F	ASC	TAC	F	ASC
ME (%)	-24.69 ± 2.91	-1.06 ± 0.23	-22.88 ± 11.73	-19.71 ± 3.48	-1.07 ± 0.58	-16.26 ± 8.76	-25.01 ± 11.22	0.76 ± 0.11	-32.88 ± 15.50	-27.00 ± 15.89	0.76 ± 0.11	-17.40 ± 7.89
	57.09 ± 2.95	96.22 ± 5.26	58.90 ± 5.60	60.29 ± 7.79	91.22 ± 7.70	66.70 ± 12.30	51.43 ± 5.59	96.66 ± 1.99	56.43 ± 14.40	62.37 ± 7.88	96.66 ± 1.99	63.03 ± 15.80
	66.40 ± 1.30	97.04 ± 2.25	68.90 ± 2.14	55.19 ± 1.15	94.72 ± 7.10	64.19 ± 1.41	59.81 ± 2.98	98.49 ± 1.74	61.32 ± 5.59	65.28 ± 15.4	98.49 ± 1.74	62.36 ± 9.15
PE (%)	-16.68 ± 8.34	0.92 ± 0.02	-31.27 ± 7.17	-8.45 ± 3.57	0.91 ± 0.07	-10.32 ± 8.40	-22.60 ± 16.86	0.99 ± 0.06	-36.09 ± 18.33	-25.74 ± 10.96	0.99 ± 0.06	-11.07 ± 5.57
	36.24 ± 1.74	99.91 ± 8.49	51.10 ± 3.74	51.55 ± 5.57	84.30 ± 11.49	53.57 ± 19.77	67.51 ± 13.84	97.07 ± 1.70	69.91 ± 8.49	57.09 ± 2.95	97.07 ± 1.70	58.90 ± 5.60
	61.10 ± 1.15	95.31 ± 4.88	65.51 ± 3.51	60.28 ± 5.31	88.79 ± 15.23	63.48 ± 10.67	65.31 ± 4.88	97.56 ± 2.15	67.01 ± 5.38	66.40 ± 1.30	97.56 ± 2.15	68.90 ± 2.14
AR (%)	-16.68 ± 8.34	0.92 ± 0.02	-31.27 ± 7.17	-8.45 ± 3.57	0.91 ± 0.07	-10.32 ± 8.40	-22.60 ± 16.86	0.99 ± 0.06	-36.09 ± 18.33	-25.74 ± 10.96	0.99 ± 0.06	-11.07 ± 5.57
	36.24 ± 1.74	99.91 ± 8.49	51.10 ± 3.74	51.55 ± 5.57	84.30 ± 11.49	53.57 ± 19.77	67.51 ± 13.84	97.07 ± 1.70	69.91 ± 8.49	57.09 ± 2.95	97.07 ± 1.70	58.90 ± 5.60
	61.10 ± 1.15	95.31 ± 4.88	65.51 ± 3.51	60.28 ± 5.31	88.79 ± 15.23	63.48 ± 10.67	65.31 ± 4.88	97.56 ± 2.15	67.01 ± 5.38	66.40 ± 1.30	97.56 ± 2.15	68.90 ± 2.14

* Data are presented as arithmetic mean ± standard deviation, F: factor (calculated as the ratio of TAC peak area/ASC peak area); ME: matrix effect; PE: process efficiency; AR: absolute recovery; WB: whole-blood method; dTAC: internal standard; ASC: ascomycin as internal standard; TAC: tacrolimus 3.3. Development of VAMS capillary-blood method of TAC quantification.

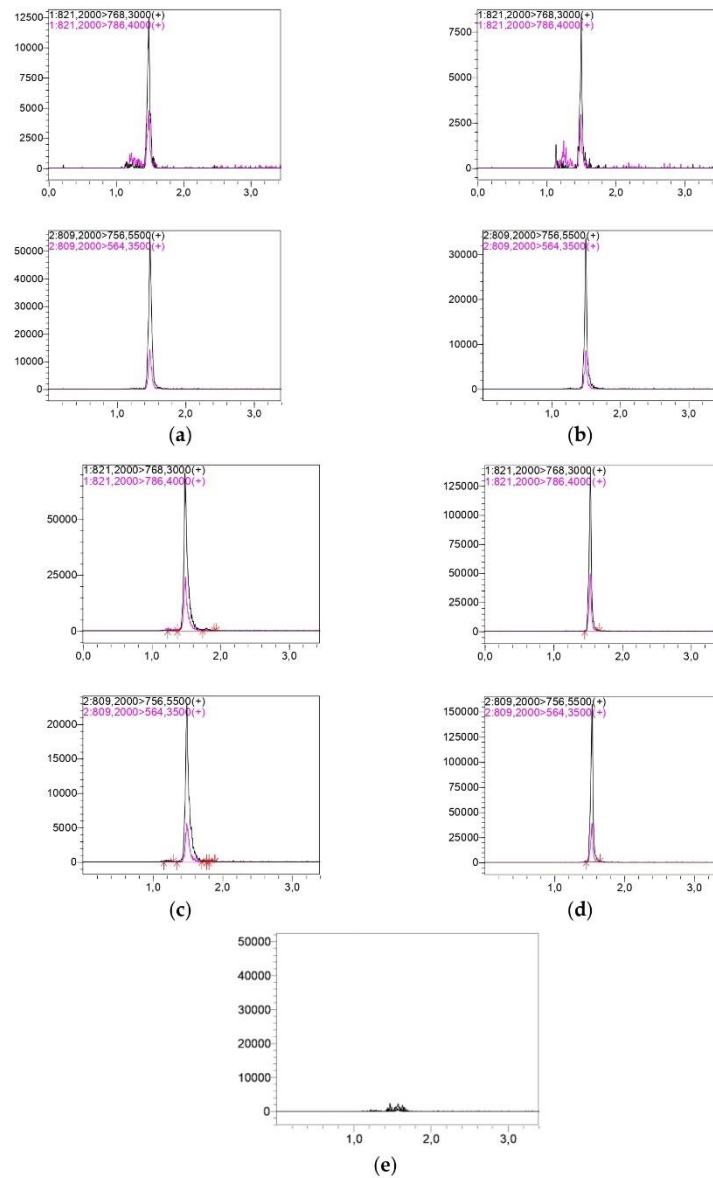


Figure 2. Representative chromatograms of two events (1st for TAC and 2nd for ASC respectively) for: (a) whole-blood patient sample—measured concentration: 3.84 ng/mL, (b) VAMS patient sample—measured concentration: 5.15 ng/mL, (c) the LLOQ—0.5 ng/mL for VAMS method, (d) the HQC—60 ng/mL for VAMS method, (e) blank sample (total ion chromatogram—TIC).

3.3. Validation of VAMS Capillary-Blood Method of TAC Quantification

LC-MS/MS method, based on samples obtained by VAMS, was successfully validated in the TAC calibration range of 0.5–60 ng/mL, using ASC as IS.

The methods calibration model (weighted $1/x$), summarized as the mean of the R^2 of 10 calibration curves, was 0.998 ($y = 0.038x + 0.01$). Each calibration curve consisted of seven concentration levels, and blank and zero samples were used for selectivity testing for whole blood. The chromatographic signals of unknown or endogenous substances were lower than 15% of the LLOQ concentration (0.5 ng/mL), demonstrating the excellent selectivity of the method. The lower limit of quantification (LLOQ) was set experimentally at 0.5 ng/mL based on chromatogram observations and signal-to-noise ratio (S/N).

The accuracy and precision parameters of TAC concentrations at the LLOQ, MQC₁, MQC₂, and HQC were within the EMA acceptance ranges (accuracy within 85–115%, imprecision less than 15%, and less than 20% for LLOQ) [15]. Interestingly, the IATDMCT recommendations regarding the precision of TDM methods (CV < 10%) were also fulfilled for the examined QCs. The intra- and between-run precision and accuracy values for LLOQ, MQC₁, MQC₂, and HQC concentrations are presented in Table 2.

The evaluation of the carry effect was satisfactory and fulfilled the EMA validation criteria: $1.97 \pm 2.23\%$ for TAC; $0.27 \pm 0.16\%$ for ASC [15].

The stability values of TAC concentrations in samples at room temperature during the stop-work procedure were also satisfactory for MQC₁ and MQC₂ concentrations of TAC (7.50 and 25 ng/mL, respectively). The mean stability levels set at two hours before and after extraction were calculated and are summarized in Table 3.

The stability test (six replicates; four time points: initial day 0, day 1, day 3, and day 5, for both IS) during storage at 5 °C in an autosampler confirmed the satisfactory stability of the analytes in the samples (Table 6).

Table 6. Autosampler stability for VAMS method—ASC as IS ($n = 6$).

The Concentration of TAC [ng/mL]	Calculated Concentration * (ng/mL) and Stability (%)			
	Initial Day	after 24 h	after Three Days	after Five Days
LLOQ (0.50)	0.55 ± 0.10; 100.00	0.53 ± 0.09; 94.43	0.49 ± 0.11; 86.87	0.48 ± 0.10; 87.57
LQC (0.75)	0.72 ± 0.08; 100.00	0.68 ± 0.09; 94.24	0.64 ± 0.07; 88.71	0.60 ± 0.09; 82.96
MQC1 (7.50)	7.43 ± 0.22; 100.00	6.97 ± 0.27; 94.24	6.80 ± 0.18; 91.49	6.41 ± 0.53; 86.32
MQC2 (25.0)	26.27 ± 1.02; 100.00	24.72 ± 0.90; 94.10	23.63 ± 1.20; 89.97	23.90 ± 1.43; 91.01
HQC (60.0)	62.96 ± 1.51; 100.00	61.89 ± 1.49; 98.30	58.94 ± 1.19; 93.61	57.19 ± 1.46; 90.83

* Data are expressed as the mean concentration ± SD and stability.

Matrix effects were evaluated in the pre- and postextraction experiments. In addition, the absolute recovery (AR, %) and process efficiency (PE, %) were calculated for TAC, ASC, ¹³C₂-TAC, and TAC/IS peak area ratios (Table 7). According to the EMA guidelines, the ratio values were within the acceptable range [15].

3.4. Clinical and Demographic Data

Fifty patients (33 boys and 17 girls; age range: 2.23–17.92 years old) after KTX in the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw (CMHI) were included randomly in the study to check the utility and availability of TAC concentration measurement methods. Patients were included in the study without special requirements according to their characteristics, especially the clinical picture, comorbidities, or TAC PK data. Three samples were obtained from each patient: two 2 mL whole-blood samples (for CMIA and WB-LC-MS/MS) and a Mitra™ microsampling device. The methods developed in this study (WB-LC-MS/MS and VAMSLC-MS/MS) were used for TAC concentration measurements. A routinely performed automatic CMIA procedure was also included to compare the results for each patient. Informed consent was obtained from all renal transplant patients in the study (or their legal guardians) before venipuncture and capillary-blood collection using VAMS. Blood samples were collected from three days to 183 months after renal transplantation. TAC concentrations (in ng/mL) ranged from 3.10 to 28.13, 3.70 to 26.71, and 4.12 to 26.30, obtained by the VAMS, WB, and CMIA methods, respectively. The patient characteristics are presented in Table 8.

Table 7. Results of matrix effect, process efficiency, and absolute recovery examination VAMS [$n = 6$].

Parameter	Low QC=0.50			MQC=7.50			MQC=25.00			HQC=60.00		
	TAC	ASC	F	TAC	ASC	F	TAC	ASC	F	TAC	ASC	F
ME [%]	-8.08 ± 1.56	-9.35 ± 1.70	0.99 ± 0.03	-12.29 ± 5.34	-17.03 ± 7.62	0.86 ± 0.07	-12.21 ± 6.70	-18.27 ± 5.24	0.93 ± 0.05	-15.38 ± 2.51	-20.10 ± 7.21	0.86 ± 0.10
PE [%]	65.61 ± 3.37	68.38 ± 5.23	95.09 ± 2.40	60.73 ± 5.81	68.96 ± 10.70	87.07 ± 3.30	56.87 ± 3.84	60.41 ± 3.13	96.66 ± 1.99	61.45 ± 7.40	67.07 ± 8.47	92.04 ± 7.67
AR [%]	66.40 ± 1.30	68.64 ± 5.36	95.61 ± 3.34	61.61 ± 2.91	68.85 ± 2.76	89.72 ± 2.44	59.81 ± 2.98	58.52 ± 4.31	104.14 ± 3.13	66.97 ± 1.91	68.99 ± 3.80	97.67 ± 1.46

Data are presented as arithmetic mean ± standard deviation; F: factor (calculated as the ratio of TAC: peak area/ASC: peak area); ME: matrix effect; PE: process efficiency; AR: absolute recovery; ASC: ascomycin as ITSD; TAC: tacrolimus.

Table 8. Patient characteristics and demographic data ($n = 50$).

Variable	Patients' Characteristics *
number of patients	50
total number of samples	150
sex [male/female]	33/17
age [years]	12.51 ± 3.87 (2.23–17.92)
body weight [kg]	45.07 ± 19.50 (10.20–97.90)
height [m]	1.43 ± 0.21 (0.81–1.80)
time after KTX [months]	37.82 ± 41.59 (0.10–183.00)
TAC daily dose [mg]	5.17 ± 3.21 (1.50–6.00)
TAC dose/body weight ratio [mg/kg]	0.13 ± 0.08 (0.03–0.30)
TAC formulation [Prograf®/Advagraf®]	42/8
HCT (hematocrit level) [%]	36.45 ± 4.83 (25.30–46.10)
creatinine value [mg/dL]	0.95 ± 0.48 (0.39–2.83)
GFR [mL/min/m ²]	70.31 ± 19.30 (22.62–99.24)
VAMS tacrolimus concentration [ng/mL]	7.33 ± 3.84 (3.10–28.13)
WB tacrolimus concentration [ng/mL]	7.44 ± 3.58 (3.70–26.71)
CMIA tacrolimus concentration [ng/mL]	±3.61 (4.12–26.30)

* Data are expressed as mean ± SD (with min/max range); KTX, kidney transplantation; TAC, tacrolimus; GFR, glomerular filtration rate; VAMS, volumetric absorptive microsampling; WB, whole blood; CMIA, chemiluminescent microparticle immunoassay.

3.5. Patient Samples and Clinical Application

Successfully validated LC-MS/MS methods for TAC determination were used to analyze samples obtained from pediatric renal transplant patients. Additionally, the routinely used CMIA method was performed using the CMHI as a regular follow-up TAC trough concentration control. Maximum trough concentrations were: 28.13, 26.71, and 26.30 ng/mL for VAMS, WB-LC-MS/MS, and CMIA assays, respectively. Minimum TAC concentrations were: 3.10, 3.70, and 4.12 ng/mL for VAMS, WB-LC-MS/MS, and CMIA assays, respectively. The concentrations obtained using the three TAC methods are shown in Figure 3 for each patient. Representative chromatograms of patient samples based on WB and VAMS are shown in Figure 2. The full results of TAC determination using the described methods and hematocrit value (HCT) are published in the Figshare file [22].

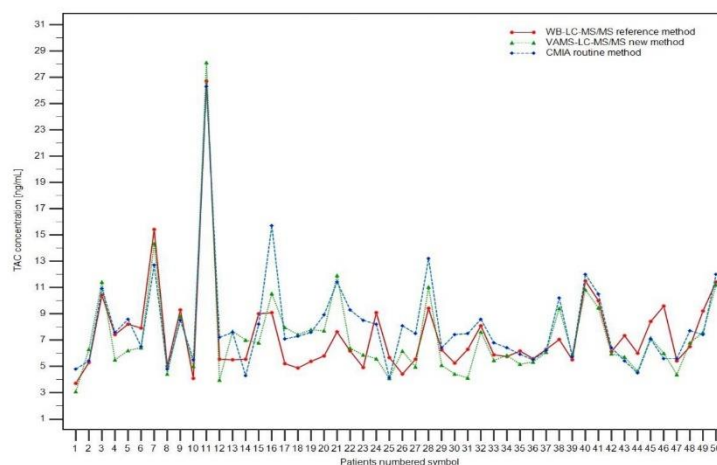


Figure 3. Graphical comparison of results obtained by the new VAMS LC-MS/MS method (green line with triangles), reference WB-LC-MS/MS method (red line with circles), and the routinely used automatic CMIA method (blue line with diamonds).

3.6. Statistical Evaluation of Methods Correlation

The correlation between the developed and validated methods were evaluated using Passing–Bablok and Pearson correlation coefficient calculations. The mean bias between the methods was assessed using the Bland–Altman plot (Figure 4).

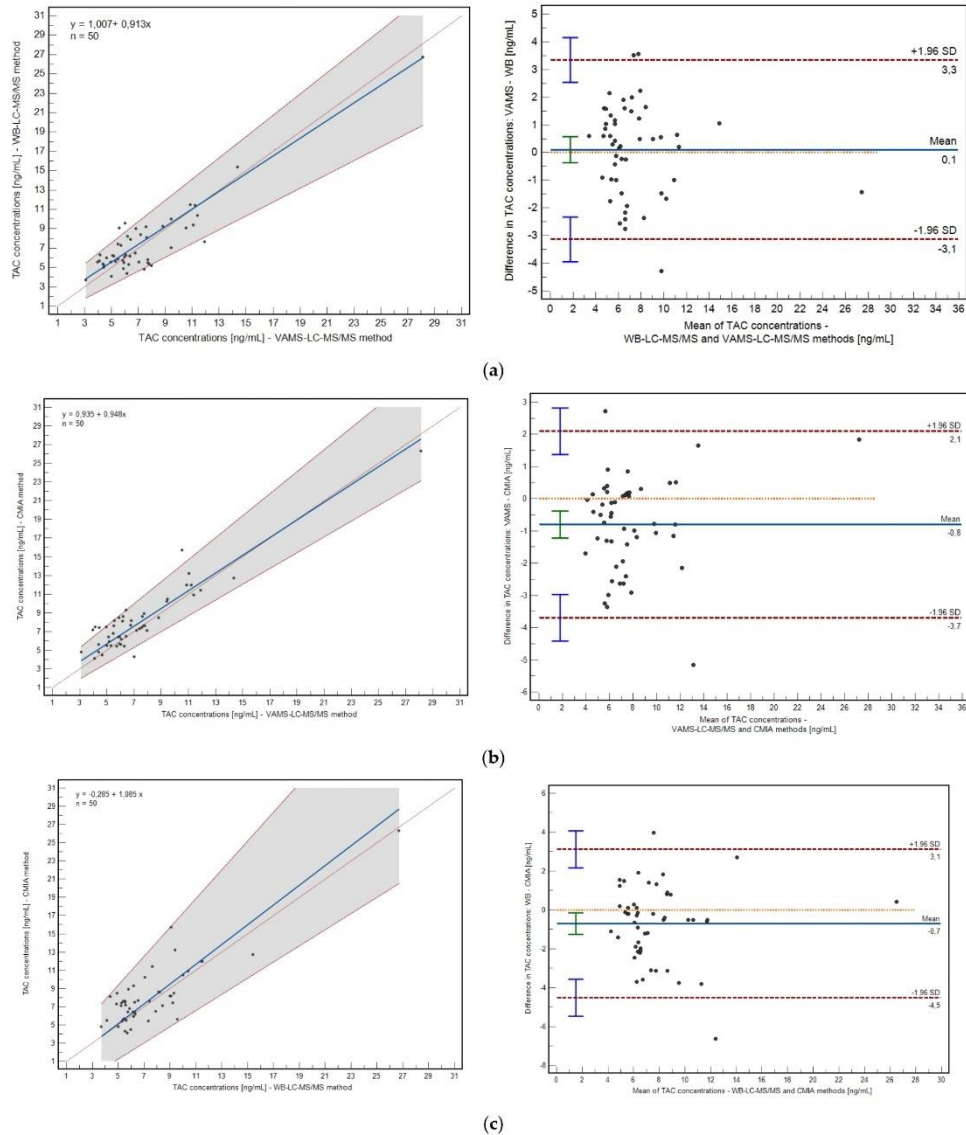


Figure 4. Comparison of TAC concentration results obtained from three described methods: (a) Passing–Bablok regression and Bland–Altman bias plot for WB-LC-MS/MS vs. VAMSLC-MS/MS; (b) Passing–Bablok regression and Bland–Altman bias plots for VAMSLC-MS/MS vs. CMIA; and (c) Passing–Bablok regression and Bland–Altman bias plot for WB-LC-MS/MS vs. CMIA.

The method based on VAMS and the WB method demonstrated a high correlation: 0.91 ($p < 0.0001$; 0.8342 to 0.9440, 95% confidence interval, CI), as well as the relationship between VAMS and the CMIA method: 0.92 ($p < 0.0001$; 0.8676 to 0.9558, 95% CI). Passing–Bablok regression confirmed high correlations for both relationships; the intercept and slope were within their statistical acceptance criteria (VAMS/WB: $y = 1.006 + 0.9129x$; VAMS/CMIA: $y = 0.934 + 0.948x$). The mean bias of the prescribed methods is shown in Figure 4. The mean difference in the case of VAMS/VB revealed 0.1046 ng/mL (−0.37 to 0.57, 95% CI), and for VAMS/CMIA comparison, it was −0.80 ng/mL (−1.22 to −0.38, 95% CI).

The differences between the VAMS/WB and VAMS/CMIA method pairs were acceptable in the (−1.96 SD; +1.96 SD) range. Percent bias was −2.72% (−9.50 to 4.05) and −11.91% (−17.78 to −6.04) for VAMS/WB and VAMS/CMIA correlations, respectively.

3.7. Evaluation of Potential Hematocrit Effect in VAMS Samples

To determine the effect of hematocrit level, the correlation between hematocrit level (HCT, %) and TAC concentration (from VAMS, ng/mL) was evaluated for each patient included in the study. The Pearson correlation coefficient was less than zero, confirming that no correlation was observed in this case. Additionally, the correlation coefficients were calculated for the hematocrit percentage value and the difference between the TAC concentration obtained by the VAMS and WB methods or the VAMS and CMIA methods. The results are presented as a scatter diagram with a hot map (Figure 5). The Pearson coefficients were 0.1213 (−0.1626 to 0.3866 95% CI) and −0.1078 (−0.3749 to +0.1758 95% CI) for the correlation of hematocrit value and (VAMS-WB) or (VAMS-CMIA) differences in measured TAC concentration, respectively, for each pediatric patient included in the study. To the best of our knowledge, this is the first study investigating the hematocrit effect in the pediatric population.

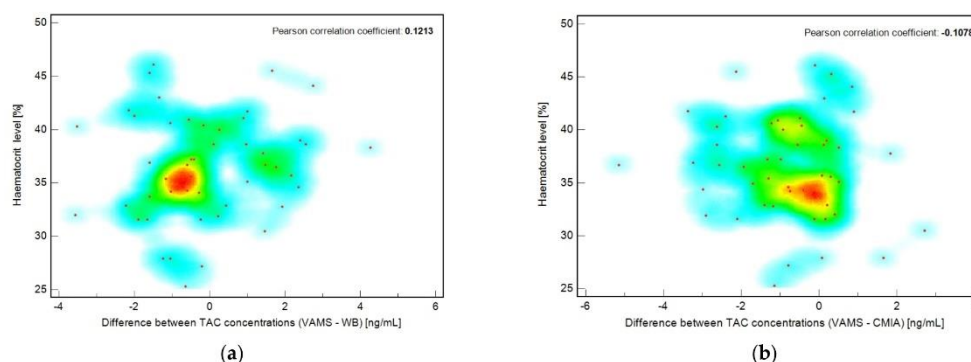


Figure 5. Scatter diagrams showing the poor correlation between percent hematocrit value (HCT) and differences in TAC concentrations (ng/mL) between (a) VAMS method results and WB method results for each patient and (b) VAMS method results and CMIA results for each patient. The hot map with color coding indicates the density of points according to the relationship investigation between the compared data.

3.8. Incurred Sample Reanalysis Results

The percent difference between the initial concentration value and the concentration level measured during the reanalysis should not be more significant than 20% of their mean for at least 67% repetitions. The differences have been calculated according to the following formula: $(\text{repeat value} - \text{initial value}) / \text{mean value of both}$ and expressed as percent ratio [14]. In this study, all fulfilled the acceptance criteria for both validated methods. The calculation and final results of the ISR experiment can be found in the Figshare file [23].

4. Discussion

New methods for tacrolimus determination in whole and capillary blood were successfully established and validated. Statistical evaluation using Passing–Bablok regression and Bland–Altman plots confirmed a good correlation between the results of TAC determination in VAMS and drug concentration values obtained from wet blood. ISR experiment results confirmed satisfactory accuracy of incurred sample determination for both validated methods and limited anomalous analytical findings for reference and VAMS methods. We believe developing and validating an LC-MS/MS method for TAC determination in whole blood is necessary for sample preparation, method testing, and MS parameter optimization. During the validation of the methods based on two different IS, deuterated TAC and ASC, the structural analog of TAC was chosen as the target in VAMS LC-MS/MS method development. This step was the starting point for developing and validating the LC-MS/MS method based on VAMS and its subsequent evaluation.

Some studies have reported that 24 h is a suitable time for drying a VAMS sampler under ambient conditions [24,25]. In our study, a reduction in the drying time to 1 h assured a high recovery of TAC, and no significant differences between the 2 h and 1 h period of VAMS drying were observed. Vethe et al. reported that 3 h of VAMS drying is satisfactory [26]. Kita et al. [27] and Koster et al. [28] reported that drying VAMS may be reduced to 2 h with no significant differences in TAC extraction accuracy.

LC-MS/MS is considered the gold standard for TAC determination and is accepted as a reference method in TDM laboratories [3,4]. Detection coupled with chromatography is characterized by excellent selectivity, sensitivity, and short analysis runtime. More than half of the TDM laboratories declared that LC-MS/MS determination of TAC was used as a reference method [5]. CMIA is used more often in smaller TDM laboratories. The primary disadvantage of immunoassays compared with LC-MS/MS is that their reliability is degraded by problems related to specific issues [3–5]. By contrast, validated and maintained chromatographic methods guarantee adequate and specific thorough determinations free of interference. In comparison, CMIA is easier to perform in classical laboratories because ready-to-use kits are available in the diagnostic market. In addition, commercial calibrators are readily available, which guarantees less variability among TDM laboratories.

Performing VAMS analysis in our case took no longer than 2.5 h in summary, including the drying step and extraction; to the best of our knowledge, it is the most rapid analytical process thus far developed in the case of TAC determination. The duration of the chromatographic run was set to 5 min, although the length could be reduced by considering the retention times of the TAC and ISs. However, the longer time used in this study provided satisfactory purification of the LC-MS/MS system based on the unknown and endogenous compounds.

There are two approaches to IS loading in the VAMS methods: pre- and postsampling. The addition of the IS to the tip normalized the tip volume and satisfactorily compensated for problems with high recovery variability. However, this approach is the most difficult because the samplers require special preparation before sampling, namely, spiking with an IS solution with a specific concentration. In our case, when IS was loaded postsampling, the accuracy and precision parameters were within EMA validation ranges. Protti et al. concluded that IS should be added immediately during the analytical process [29]. In most published studies, IS was added to the solution for analyte extraction from VAMS [24–26,29–33]. In a survey by Kita et al. [27], ASC was added after extraction from the VAMS tip, similar to our LC-MS/MS method.

Adaway and Keevil [33] reported that ASC, rather than $^{13}\text{C}_2\text{D}_2\text{-TAC}$, is characterized by better stability in protein precipitation solvents such as acetonitrile. Deuterated TAC may interfere with mass transitions considering the limited purity of this IS. Tron et al. used ASC as an internal standard in an LC-MS/MS assay based on TAC determination in adult patients [30]. The correlation between the reference whole-blood method and VAMS was satisfactory (Pearson correlation = 0.968) [30]. In our case, the validation results with

ASC were more satisfactory than those with $^{13}\text{C}_2\text{D}_2$ -TAC quantification in whole blood. Therefore, we used ASC as the IS for TAC determination in the VAMS samples.

However, the manufacturer declared that the VAMS technique is independent of the hematocrit level, and its potential influence was tested in some studies. The impact of hematocrit is still unclear in some cases of using VAMS [34,35]. In a survey by Spooner et al., where the potential HCT effect was evaluated in model experiments, unequivocally, in the 20–70% range of HCT values, the visual correlation between the preferred adsorption of plasma and erythrocytes was not significant [9]. Capiou and Stove recommended simple methods to predict the HCT level in VAMS by simultaneously determining the potassium level and quantifying the primary analyte [34]. In our study, the correlation between TAC concentration differences (WB–VAMS) and HCT levels was insignificant. Consequently, the hematocrit effect was not observed in this study, and there was no relationship between HCT values and TAC blood levels, as in previous studies on adult transplant recipients [27,28,30–33].

Zwart et al. discussed the higher imprecision of VAMS in DBS devices [24]. However, appropriate sampling with DBS is more difficult for patients than for VAMS. The VAMS device was more attractive to patients than the DBS device. In conclusion, the VAMS technique could be used in cases of stable renal transplant recipients, as well as in cases of initiation of pharmacotherapy and clinically unstable transplant patients. In the same study, it was also evaluated that in the case of hematocrit range characteristic for transplant patients (0.20–0.60), the results of TAC determination are reliable, without significant correlation between TAC and HCT levels [24].

Organic solvents have been reported to be the best for hydrophobic analyte extraction from hydrophilic VAMS tips; however, in our case, water was a better extraction solvent, with satisfactory process recovery. Ye and Gao reported that a mixture of organic solvents and water was characterized by a lower elution strength, which reduced the recovery from VAMS [35]. Koster et al. [28] and Paniagua-Gonzales et al. [25] concluded that a mixture of water and methanol provides the best extraction results. According to HCT, organic solvents reduce the hematocrit effect for specific analytes. In our study, HCT ranged from 25.30% to 46.10%, and no influence was observed.

The significant social impact and clinical potential of microsampling during immunosuppressive therapy outweigh the use of VAMS as a routine sampling method, especially in the pediatric population. Mbughuni et al. conducted a questionnaire study on satisfaction and experience with VAMS; 82% of the examinees preferred to use Mitra™ instead of venous samples [36]. After our clinical experience with VAMS blood collection, all patients included in our study and their guardians showed an interest in the VAMS technique and its potential role in the TDM of TAC, including blood collection at home.

Previous studies on TAC determination in adult samples obtained using VAMS cannot be extrapolated to the pediatric population. Based on the PK of TAC, total body clearance (CL) in children resulted in the administration of 1.2–2-times-higher doses of TAC to ensure the efficiency of TAC action and its appropriate concentration levels at a steady state [37]. To date, excluding our study, only Kindem et al. [12] have described the clinical use of VAMS in TAC monitoring in pediatric transplant recipients, as well as in the case of home sampling based on a method developed and validated by Vethe et al. [26].

Our study has some limitations. It was a single-center study, and the data could not be extrapolated to the pediatric population. The impact of self-sampling by VAMS at home and the stability of samples under different conditions are required in the next step of our investigation to simulate the home sampling challenges and logistics process of sample transfer between patients and TDM laboratories. The stability of VAMS after sampling should be tested under different conditions, according to the logistic process related to obtaining samples from TDM laboratories using the classic post. Vethe et al. concluded that postal shipment does not influence the average recovery of TAC from VAMS samplers [26]. This study was performed in adult patients, and a stability examination for home-based VAMS in the pediatric population is still needed.

5. Conclusions

It can be concluded that a high possibility of regular application in the therapeutic drug monitoring of tacrolimus represents an analytical method based on the VAMS. However, both have been correlated to a high degree and have consistently used one of methods; the process for individual patients is still recommended. The VAMS technique is patient-friendly and simplifies TDM; consequently, it may minimize noncompliance with therapeutic regimens because of the simplicity of blood collection and the fact that almost anyone can obtain samples precisely and quickly, anywhere, at any time without visiting a hospital. Due to the limited number of pediatric transplant centers and recent SARS-CoV-2 pandemic restrictions, this approach to blood collection seems to be an attractive alternative for young patients, their families, and all personnel involved in post-transplant pharmacotherapy. Nevertheless, the unit price of the VAMS assay is higher (around USD 3–4) than the determination of TAC with WB-LC-MS/MS or CMA methods. Still, as a consequence, from a long-term perspective, home-based self-sampling with VAMS seems to be more beneficial for healthcare systems than regular follow-up visits. The VAMS technique provides the room to recognize PK data in the pediatric population, including pharmacokinetic profiles and a limited sample strategy (LSS), which has not yet been fully developed.

Author Contributions: Conceptualization, T.P., D.M. and A.K.; methodology, D.M. and A.K.; validation, A.K. and D.M.; formal analysis, A.K., D.M. and A.C.; investigation, A.K. and D.M.; resources, A.K., D.M., T.P. and J.R.; data curation, A.K., D.M. and J.R.; writing—original draft preparation, A.K.; writing—review and editing, T.P. and D.M.; visualization, A.K., D.M. and T.P.; supervision, T.P. and D.M.; project administration, A.K.; funding acquisition, A.K. and T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Part of this research was supported by the Medical University of Warsaw, Poland (grant number: FW22/1/F/MB/N/22 [F/MB/01/22]). The Medical University of Warsaw funded the APC.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw (protocol code: 17/KBE/2022; date of approval: 20 April 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Special acknowledgements should be given to pediatric patients who voluntarily participated in the study. The authors thank the Kidney Transplantation Clinic’s medical staff and the Pharmacokinetics Laboratory’s analytical staff (Children’s Memorial Health Institute in Warsaw) for the clinical data, sample collection, and CMA method. The authors also would like to thank: Magdalena Bodnar-Broniarczyk (Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw) for advice and tips according to tacrolimus concentration LC-MS/MS measurement, Paweł Czarnowski (Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw) for help during statistical evaluation, and Katarzyna Bronicz (Warsaw School of Economics) for language support and remarks.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study design, collection, analysis, interpretation of data, writing of the manuscript, or decision to publish the results.

References

1. Papalois, V.E.; Najarian, J.S. Pediatric kidney transplantation: Historic hallmarks and a personal perspective. *Pediatr. Transplant.* **2001**, *5*, 239–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2009**, *9*, S1–S155. [[CrossRef](#)]
3. Brunet, M.; van Gelder, T.; Åsberg, A.; Haufroid, V.; Hesselink, D.A.; Langman, L.; Lemaitre, F.; Marquet, P.; Seger, C.; Shipkova, M.; et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus—Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 261–307. [[CrossRef](#)]

4. Seger, C.; Shipkova, M.; Christians, U.; Billaud, E.M.; Wang, P.; Holt, D.W.; Brunet, M.; Kunicki, P.K.; Pawiński, T.; Langman, L.J.; et al. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Ther. Drug Monit.* **2016**, *38*, 170–189. [CrossRef]
5. Christians, U.; Vinks, A.A.; Langman, L.J.; Clarke, W.; Wallemacq, P.; van Gelder, T.; Renjen, V.; Marquet, P.; Meyer, E.J. Impact of Laboratory Practices on Interlaboratory Variability in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*, 718–724. [CrossRef]
6. Wallemacq, P.; Armstrong, V.W.; Brunet, M.; Haufroid, V.; Holt, D.W.; Johnston, A.; Kuypers, D.; Le Meur, Y.; Marquet, P.; Oellerich, M.; et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: Report of the European consensus conference. *Ther. Drug Monit.* **2009**, *31*, 139–152. [CrossRef]
7. Capiau, S.; Veenhof, H.; Koster, R.A.; Bergqvist, Y.; Boettcher, M.; Halmingh, O.; Keevil, B.G.; Koch, B.; Linden, R.; Pistos, C.; et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 409–430. [CrossRef]
8. Denniff, P.; Spooner, N. Volumetric absorptive microsampling: A dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8489–8495. [CrossRef]
9. Spooner, N.; Denniff, P.; Michielsen, L.; De Vries, R.; Ji, Q.C.; Arnold, M.E.; Woods, K.; Woolf, E.J.; Xu, Y.; Boutet, V.; et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: Overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 653–659. [CrossRef]
10. Avataneo, V.; D'Avolio, A.; Cusato, J.; Cantù, M.; De Nicolò, A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *166*, 40–51. [CrossRef]
11. Kocur, A.; Pawiński, T. Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 681. [CrossRef]
12. Kindem, I.A.; Bjerre, A.; Åsberg, A.; Midtvedt, K.; Bergan, S.; Vethe, N.T. Tacrolimus Measured in Capillary Volumetric Microsamples in Pediatric Patients—A Cross-Validation Study. *Ther. Drug Monit.* **2021**, *43*, 371–375. [CrossRef]
13. Kocur, A.; Marszałek, D. Short protocol of TAC determination in whole blood samples with LC-MS/MS system. *Figshare J. Contrib.* **2023**. [CrossRef]
14. Kocur, A.; Marszałek, D. Description of the LC-MS/MS method for TAC determination in VAMS samples collected from kidney transplant pediatric patients. *Figshare J. Contrib.* **2022**. [CrossRef]
15. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. 2011. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed on 2 November 2022).
16. Bodnar-Broniarczyk, M.; Pawiński, T.; Kunicki, P.K. Isotope-labeled versus analog internal standard in LC-MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples—A compensation of matrix effects. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1104*, 220–227. [CrossRef]
17. Bodnar-Broniarczyk, M.; Warzyszyńska, K.; Czerwińska, K.; Marszałek, D.; Dziewa, N.; Kosieradzki, M.; Pawiński, T. Development and Validation of the New Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Unbound Tacrolimus in the Plasma Ultrafiltrate of Transplant Recipients. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 632. [CrossRef]
18. Zhou, W.; Yang, S.; Wang, P.G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* **2017**, *9*, 1839–1844. [CrossRef]
19. Taylor, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 328–334. [CrossRef]
20. De, B.K.; Jimenez, E.; De, S.; Sawyer, J.C.; McMillin, G.A. Analytical performance characteristics of the Abbott Architect i2000 Tacrolimus assay; comparisons with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and Abbott IMx methods. *Clin. Chim. Acta* **2009**, *410*, 25–30. [CrossRef]
21. CMLA Tacrolimus Manual Guide REF 1L77/B1L771 G4-5918/R08; Abbott Laboratories: Abbott Park, IL, USA, 2013.
22. Kocur, A.; Marszałek, D. Results of TAC determination based on WB, VAMS and CMLA methods and HCT levels in renal transplant paediatric recipients. *Figshare J. Contrib.* **2022**. [CrossRef]
23. Kocur, A. Incurred samples reanalysis experiment for tacrolimus determination in VAMS and whole blood samples obtained from pediatric patients after renal transplantation. *Figshare J. Contrib.* **2023**. [CrossRef]
24. Zwart, T.C.; Metscher, E.; van der Boog, P.J.M.; Swen, J.J.; de Fijter, J.W.; Guchelaar, H.J.; de Vries, A.; Moes, D. Volumetric microsampling for simultaneous remote immunosuppressant and kidney function monitoring in outpatient kidney transplant recipients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *88*, 4854–4869. [CrossRef] [PubMed]
25. Paniagua-González, L.; Díaz-Louzao, C.; Lendoiro, E.; Otero-Antón, E.; Cadarso-Suárez, C.; López-Rivadulla, M.; Cruz, A.; de-Castro-Ríos, A. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by LC-MS/MS using a novel atmospheric pressure ionization probe (UniSpray™). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113422. [CrossRef] [PubMed]
26. Vethe, N.T.; Gustavsen, M.T.; Midtvedt, K.; Lauritsen, M.E.; Andersen, A.M.; Åsberg, A.; Bergan, S. Tacrolimus Can Be Reliably Measured with Volumetric Absorptive Capillary Microsampling Throughout the Dose Interval in Renal Transplant Recipients. *Ther. Drug Monit.* **2019**, *41*, 607–614. [CrossRef]
27. Kita, K.; Mano, Y. Application of volumetric absorptive microsampling device for quantification of tacrolimus in human blood as a model drug of high blood cell partition. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 168–175. [CrossRef]

28. Koster, R.A.; Niemeijer, P.; Veenhof, H.; Hateren, K.V.; Alffenaar, J.C.; Touw, D.J. A volumetric absorptive microsampling LC-MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 495–508. [[CrossRef](#)]
29. Protti, M.; Mandrioli, R.; Mercolini, L. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1046*, 32–47. [[CrossRef](#)]
30. Tron, C.; Ferrand-Sorre, M.J.; Querzerho-Raguideau, J.; Chemouny, J.M.; Houssel-Debry, P.; Verdier, M.C.; Bellissant, E.; Lemaitre, F. Volumetric absorptive microsampling for the quantification of tacrolimus in capillary blood by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1165*, 122521. [[CrossRef](#)]
31. Veenhof, H.; Koster, R.A.; Junier, L.A.T.; Berger, S.P.; Bakker, S.J.L.; Touw, D.J. Volumetric absorptive microsampling and dried blood spot microsampling vs. conventional venous sampling for tacrolimus trough concentration monitoring. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 1687–1695. [[CrossRef](#)]
32. Mathew, B.S.; Mathew, S.K.; Aruldas, B.W.; Prabha, R.; Gangadharan, N.; David, V.G.; Varughese, S.; John, G.T. Analytical and clinical validation of dried blood spot and volumetric absorptive microsampling for measurement of tacrolimus and creatinine after renal transplantation. *Clin. Biochem.* **2022**, *105–106*, 25–34. [[CrossRef](#)]
33. Adaway, J.E.; Keevil, B.G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *883–884*, 33–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Capiou, S.; Stove, C. Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *190*, 113491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ye, Z.; Gao, H. Evaluation of sample extraction methods for minimizing hematocrit effect on whole blood analysis with volumetric absorptive microsampling. *Bioanalysis* **2017**, *9*, 349–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mbughuni, M.M.; Stevens, M.A.; Langman, L.J.; Kudva, Y.C.; Sanchez, W.; Dean, P.G.; Jannetto, P.J. Volumetric Microsampling of Volumetric Microsampling of Capillary Blood Spot vs Whole Blood Sampling for Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus and Cyclosporin A: Accuracy and Patient Satisfaction. *J. Appl. Lab. Med.* **2020**, *5*, 516–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bansal, S.B. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus in kidney transplantation. *Indian J. Transplant.* **2020**, *14*, 8. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

(3) Publikacja oryginalna – oznaczona jako **P₃** [IF=4,40; 140 pkt. MNiSW]
Kocur A*, Rubik J, Czarnowski P, Czajkowska A, Marszałek D, Sierakowski M, Górska
M, Pawiński T. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using
Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients
Treated Concomitantly With Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-
Validation, And Clinical Application. *Pharmacological Reports*. 2023;
publish ahead of print <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00509-w>.



Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application

Arkadiusz Kocur^{1,2} · Jacek Rubik³ · Paweł Czarnowski⁴ · Agnieszka Czajkowska² · Dorota Marszałek¹ · Maciej Sierakowski⁵ · Marta Górska² · Tomasz Pawiński¹

Received: 19 June 2023 / Revised: 3 July 2023 / Accepted: 4 July 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Background Mycophenolic acid (MPA) is widely used in posttransplant pharmacotherapy for pediatric patients after renal transplantation. Volumetric absorptive microsampling (VAMS) is a recent approach for sample collection, particularly during therapeutic drug monitoring (TDM). The recommended matrix for MPA determination is plasma (PL), and conversion between capillary-blood VAMS samples and PL concentrations is required for the appropriate interpretation of the results. **Methods** This study aimed to validate and develop a UHPLC-MS/MS method for MPA quantification in whole blood (WB), PL, and VAMS samples, with cross and clinical validation based on regression calculations. Methods were validated in the 0.10–15 µg/mL range for trough MPA concentration measurement according to the European Medicines Agency (EMA) guidelines. Fifty pediatric patients treated with MPA after renal transplantation were included in this study. PL and WB samples were obtained via venipuncture, whereas VAMS samples were collected after the fingerstick. The conversion from VAMS_{MPA} to PL_{MPA} concentration was performed using formulas based on hematocrit values and a regression model. **Results** LC-MS/MS methods were successfully developed and validated according to EMA guidelines. The cross-correlation between the methods was evaluated using Passing-Bablok regression, Bland-Altman bias plots, and predictive performance calculations. Clinical validation of the developed method was successfully performed, and the formula based on regression was successfully validated for VAMS_{MPA} to PL_{MPA} concentration and confirmed on an independent group of samples. **Conclusions** This study is the first development of a triple matrix-based LC-MS/MS method for MPA determination in the pediatric population after renal transplantation. For the first time, the developed methods were cross-validated with routinely used HPLC-DAD protocol.

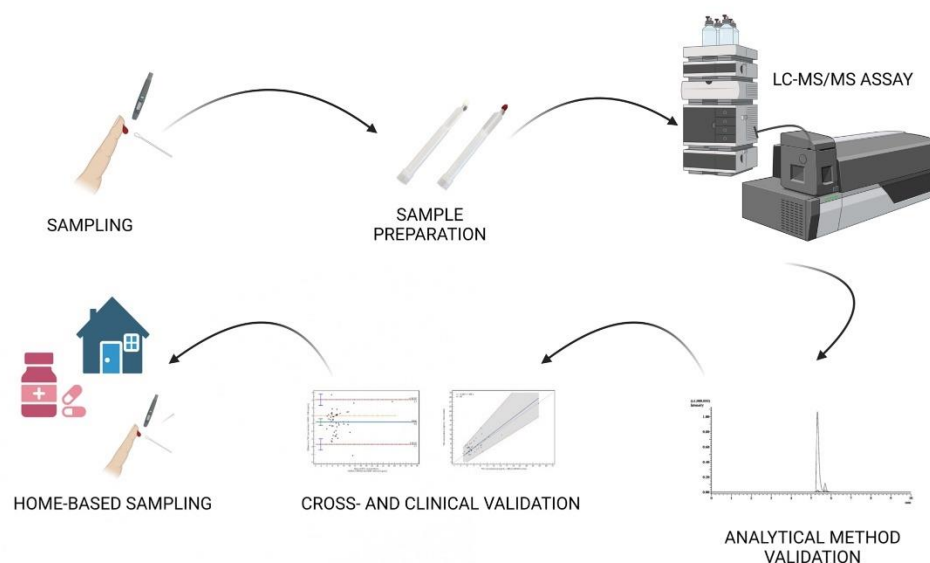
Jacek Rubik, Paweł Czarnowski and Agnieszka Czajkowska contributed equally to this work.

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 15 July 2023

Springer

Graphical Abstract



bio
RENDER Created with BioRender.com

Keywords Mycophenolic acid · Renal transplantation · VAMS · LC–MS/MS · Cross-validation · Clinical validation

Abbreviations

AcMPAG	Mycophenolic acid acyl-glucuronide	HB	Heat block
AR	Absolute recovery	HP	Heparinized plasma
C ₀	Trough concentration	HPLC–DAD	High-performance liquid chromatography coupled with diode array detection
CEDIA	Cloned enzyme donor immunoassay	HT	Hematocrit
CMHI	Children’s Memorial Health Institute	HQC	Highest quality control
CV	Coefficient of variation	IA	Immunoassay
DBS	Dried-blood-spot	IATDMCT	International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology
DL	Desolvation line		
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	IMPDH	Inosine monophosphate dehydrogenase
EMA	European Medicines Agency	IS	Internal standard
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique	ISR	Incurred sample reanalysis
ESI(+)	Positive-ion mode with electrospray ionization	KTx	Kidney transplantation
FDCC	Fixed-dose concentration controlled trial	LC–MS/MS	Liquid chromatography–tandem mass spectrometry
FLD	Fluorescence detection	LLE	Liquid–liquid extraction
FBPP	Fraction bound to plasma proteins	LLOQ	Lower limit of quantification
GCP	Good Clinical Practice	LQC	Lowest quality control

MAPE	Median absolute percentage prediction error
ME	Matrix effect
MQC	Medium quality control
MMF	Mycophenolate mofetil
MPA	Mycophenolic acid
MPAG	Mycophenolic acid glucuronide
MPE	Median prediction error
MPPE	Median percentage prediction error
MRM	Multiple reaction monitoring
PE	Process efficacy
PETINIA	Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay
PK	Pharmacokinetic
PL	Plasma
R_t	Retention time
RMSE	Root mean squared prediction error
RT	Room temperature
QC	Quality control
S/N	Signal-to-noise ratio
SD	Standard deviation
SR	Serum
TAC	Tacrolimus
TDM	Therapeutic drug monitoring
UHPLC-MS/MS	Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
URIS	Structurally unrelated internal standard
UV	Ultraviolet detection
VAMS	Volumetric absorptive microsampling
WB	Whole blood

Introduction

From a long-term perspective, pediatric patients require optimal immunosuppressive therapy after kidney transplantation (KTx) to prevent toxicity and acute or chronic graft rejection [1, 2]. Pharmacotherapy is often based on tacrolimus (TAC), a cornerstone calcineurin inhibitor, combined with mycophenolate and corticosteroids. Mycophenolates are characterized by relatively high intra- and inter-individual variability [1, 2]. In such cases, therapeutic drug monitoring (TDM) of drug concentration in the blood is essential for dosage adjustment and individualized therapy. In the case of pediatric patients, MPA has registration for post-transplant treatment, with dosing 1200 or 900 mg/m² of body surface area divided into two doses (concomitantly for cyclosporine and TAC, respectively). Some modifications may be made early after transplantation [1–3].

After administration, mycophenolate mofetil (MMF) is rapidly hydrolyzed to its active metabolite MPA. At the molecular level, MPA is a selective, specific,

non-competitive, and reversible inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) [1, 4]. In adults, MMF is monitored (but not obligatory) by measuring mycophenolic acid (MPA) in plasma; however, this is not implemented to the same degree in children [4]. The FDCC (Fixed-Dose Concentration Controlled) clinical trial with 62 pediatric patients treated with MMF showed comparable pharmacokinetic (PK) and efficacy to adults; however, children younger than 6 years needed more attention owing to potential adverse effects/toxicities [1, 4–6].

According to the IATDMCT (International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology) recommendations, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) plasma (PL), heparinized plasma (HP), and serum (SR) are suitable matrices for MPA determination [7]. MPA concentration is determined in TDM laboratories using immunoassays (IAs) or chromatographic methods. High-performance liquid chromatography (HPLC) conducted with ultraviolet spectrophotometry (UV) or a fluorescence detector (FLD) is frequently used in TDM laboratories as a routine method [1, 7]. On the other hand, the most attractive liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) is considered a method routinely used in 40% of TDM laboratories. This method is regarded as the gold standard bioanalytical method for MPA determination. Owing to the higher specificity, sensitivity, and robustness of this method, some laboratories have used it for total- and free-MPA analyses in a complicated biological matrix [7, 8]. Chromatographic methods provide good separation of MPA, AcMPAG (mycophenolic acid acyl-glucuronide), and MPAG (mycophenolic acid glucuronide), as well as in the case of metabolite dissociation in the mass detector source of MPA [1, 7]. In contrast, cross-reactivity with metabolites is characteristic of IAs. The most popular enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT), cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA), and particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA) are used as IAs for MPA determination [7]. The estimated typical C_0 (trough concentration) of MPA ranges from 1 to 4 µg/mL [1].

The importance of volumetric absorptive microsampling techniques (VAMS) in the TDM of immunosuppressants is increasing annually [9, 10]. It is an alternative to frequent venipuncture, especially in the pediatric population. A strong point of this method may be the lack of phlebotomist presence during sampling and minimized biohazard risk. The most popular is the Mitra™ device produced by Neoteryx (Torrance, CA, USA), with different tip volumes (10, 20, and 30 µL) [9]. Instead of the dried-blood-spot (DBS) technique, VAMS is independent of the hematocrit (HT) interference and volcano effects. More theoretical information and analytical considerations regarding VAMS have been described in previously

Table 1 Multiple pair monitoring mass spectrometry parameters with retention times of analytes

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Dwell time (mscc)	Retention time (min)
MPA	321.10	275.00	-15	28	5.58
	321.10	285.00	-20	28	
MPA- <i>d</i> ₃ (internal standard)	324.00	210.00	-22	28	5.58
	341.00	210.00	-35	28	
MPAG ^(only monitored)	514.21	207.04	-38	28	5.20
	514.21	303.13	-18	28	

The first line in the table for each analyte describes the parameters for the quantitative pair, while the second describes the parameters for the qualitative pair. MPA-*d*₃ was used as an internal standard in MPA quantification using LC-MS/MS method. MPAG was only monitored to avoid in-source fragmentation to free MPA

MPA mycophenolic acid, MPA-*d*₃ deuterated mycophenolic acid, MPAG mycophenolic acid glucuronide

published reviews [10, 11]. Because MPA is almost exclusively found in the plasma fraction, capillary blood may be problematic for quantifying this drug. However, some approaches may be introduced to convert MPA_{VAMS} and MPA_{PL} concentrations. The equation $MPA_{VAMS} / [1 - HCT \text{ level}] = MPA_{PL}$ is frequently used for conversion but is only suitable for drugs primarily binding with PL proteins [12, 13]. Some studies included the fraction bound to plasma protein (FBPP) factor in the above formula [14]. Other protocols assume that the equation obtained after the regression calculation (Passing-Bablok or Deming method) might be used for that conversion. However, this still depends on a specific set of data, and additional confirmation of the regression formula should be performed on the independent group of samples [12].

This study aimed to develop a method for determining MPA levels in samples obtained using a MitraTM-VAMS device. Additionally, for appropriate cross-validation and confirmation of the utility of VAMS for MPA determination, PL-LC-MS/MS and WB-LC-MS-MS analytical methods were developed and validated. Two approaches for concentration conversion were used and compared: the HT-dependent formula and the equation from the Passing-Bablok regression. The significance of the HT effect and the stability of the VAMS-loaded samples were also evaluated. Finally, successful cross and clinical validations were performed, and conversion between MPA concentrations obtained from capillary blood collected using VAMS was initially successful for the first time.

Materials and methods

Reagents and materials

The Supplementary File (Sect. 1) provides details regarding the reagents and materials used in this study.

Equipment and liquid chromatography-tandem mass spectrometry conditions

The analytical platform used for MPA determination in VAMS, WB, and plasma consisted of an 8050 triple quadrupole mass detector (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled with a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan). Additionally, the supporting auxiliary equipment was adapted. The controller (CBM-20A), pump for isocratic and low-pressure gradient flow with a modified mixer (30AD), degasser unit (DGU-20A5R), autosampler with vial racks and cooling option (SIL-30AC), and thermostatic prominence column oven (CTO-20AC) were used. The chromatographic column (150 × 3.00 mm, 2.70 μm) Poroshell 120-EC-C₁₈ and complementary guard pre-column named Poroshell UHPLC EC-C₁₈ (4.60 × 3.00 mm, 2.70 μm) were delivered by Agilent (Santa Clara, CA, USA). For appropriate chromatographic separation, the above column was maintained at 40 °C. The final mobile phase was a gradient mixture of two solutions: A (pure deionized water) and B (methanol), each with 2.5 mM ammonium fluoride and 0.05% formic acid addition. The summary flow rate was set at 0.50 mL/min during the following 10-min LC gradient program:

- 1) From injection to 1.49 min—a total volume of 95% phase A and 5% phase B;
- 2) Between 1.50 and 7.49 min—the total volume is 100% of phase B;
- 3) Between 7.49 min and the end of the run—equilibration with the same as at the initial point.

The autosampler cooler was set at 5 °C. The injection volume during assays was set as 10 μL with a 5.00 μL/sec speed of delivery into the MS detector for each examined matrix.

Optimization of source parameters and multiple pair monitoring (MRM) was established with LabSolution 5.97

(Shimadzu, Kyoto, Japan) method creator or experimentally according to peak parameter observation. The MRM pairs (target-quantitative and control-qualitative pairs) are described in Table 1, along with the retention time of the analytes (RT). The proton adduct $[M + H]^+$ was used for MPA and MPA- d_3 monitoring, whereas $[M + NH_4]^+$ was used for MPAG qualitative determination, both in positive-ion mode with electrospray ionization (ESI+). The single-event time was set to 0.062 ms.

The first MRM pair was used for validation and patient sample calculations (excluding MPAG, which was only monitored), whereas the second pair was set as the control pair.

The electrospray voltage of the detector was set to 3 kV, and the interface, desolvation line (DL), and heat block (HB) temperatures were set to 150, 250, and 400 °C, respectively. Argon was used as the collision-induced dissociation gas at 270 kPa pressure. Nitrogen was used as the drying gas and nebulizing gas (flow rates: 5 and 3 L/min, respectively), whereas air was used as the heating gas (flow rate: 14 L/min).

Calibrators and quality control preparation

The details of the calibrators and quality controls (QC) preparation are provided in the Supplementary File (Sect. 2).

Patients and sampling protocol

Fifty pediatric renal transplant recipients participated in this study. The children were treated at the Kidney Transplantation Outpatient Clinic, Children's Memorial Health Institute (CMHI), Warsaw. The patients were treated with an immunosuppressive regimen of TAC (Advagraf® or Prograf®, Astellas, Warsaw, Poland), MMF (CellCept®, Roche AG, Basel, Switzerland), and glucocorticosteroid drugs. WB-anticoagulant with EDTA was obtained before the next daily dose of immunosuppressive agents (MPA and TAC) via classic venous collection (part of the sample was used for PL collection) during regular post-transplant follow-up visits between November 2022 and February 2023. Samples of WB and PL were stored at -20 °C pending the LC-MS/MS assay. Simultaneously, VAMS samples (finger puncture by a lancet) were collected by a Medical Doctor or Nurse and analyzed during the next two weeks (held at RT in the dark; stability was confirmed in the presented study ("Validation of methods for MPA determination in whole blood, plasma, and volumetric-absorptive microsampling samples"). The pediatric participants and their parents or legal guardians provided informed consent before sampling. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, Council for International Organizations of Medical Sciences Guidelines, and Good Clinical Practice (GCP). This study

was approved by the Bioethics Committee of the Children's Memorial Health Institute in Warsaw (approval number and date: 36/KBE/2022, 19 October 2022).

Sample preparation

The details of the sample preparation are provided in the Supplementary File (Sect. 3).

Method validation

The validation process was performed according to the European Medicines Agency guidelines for bioanalytical method validation published in January 2023 and the International Association of Therapeutic Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT) guidelines for DBS-method development and consensus regarding mycophenolate treatment [1, 13, 16]. For each validated method (WB, PL, and VAMS), the following parameters were verified: selectivity, lower limit of quantification (LLOQ), calibration and linearity, accuracy and precision, carry-over, matrix effect with process efficiency and recovery, autosampler stability, long-term stability of the VAMS samplers, and short- and long-term stability of the final sample and working solutions. HCT-independence experiments for MPA in VAMS and the incurred sample reanalysis (ISR) protocol were also performed. Passing-Bablok regression, Bland-Altman plots, predictive bias, and other correlation parameters were evaluated for clinical validation.

Blank samples (without analytes) were analyzed from six different donors for each tested matrix (WB, PL, and VAMS) for selectivity evaluation. Adequate selectivity was achieved when the response of the interfering components was lower than 20% for the analyte (LLOQ) and 5% for the IS [16].

Linearity was calculated for each calibration method using linear $1/x$ weighting in the 0.10–15.0 µg/mL range based on the following concentration points: 0.10, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 µg/mL. Calibration curves were constructed for calibration and linearity parameter evaluation. Blank and zero samples were simultaneously prepared during calibration set determination. Blank samples (without IS and MPA) and zero samples (without MPA, but with IS) were prepared for interference determination during the chromatographic run.

The carry-over effect was experimentally evaluated in 20 different runs by directly injecting the HQC sample immediately before the blank sample without the analytes. According to the EMA validation guidelines, the acceptance criteria for MPA are less than 20% and less than 5% for IS [16].

Accuracy is the percentage ratio determined to the reference concentration values, and precision is the percentage coefficient of variation (CV%). This study evaluated parameters within and between runs (intra- and inter-day) in six

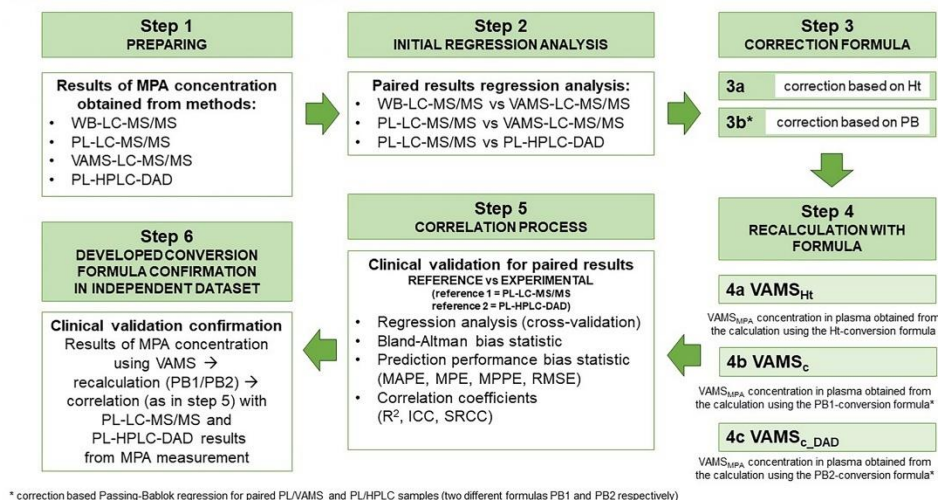


Fig. 1 Phases of cross and clinical validation are presented as the flowchart with the procedure that should be followed for each of the compared methods and paired samples. The algorithm is presented by the example of the data presented study. *WB* whole blood, *PL* plasma, *VAMS* volumetric absorptive microsampling, *LC-MS/MS* liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *HPLC-DAD* high-performance liquid chromatography with diode array detection, *PB* Passing-Bablok regression, $Vams_{Ht}$ mycophenolic acid concentration

corrected with hematocrit, $VAMS_c$ mycophenolic acid concentration corrected with regression, $VAMS_{c_DAD}$ mycophenolic acid concentration corrected with regression, *MPPE* median prediction error, *MPPE* median percentage prediction error, *RMSE* root mean squared prediction error, *MAPE* median absolute percentage prediction error, R^2 Pearson's correlation, *SRCC* Spearman rank correlation coefficient, *ICC* Intraclass correlation coefficient

repetitions for each analyzed matrix. Following EMA guidelines, the acceptance criteria for both parameters require that the mean is within 15% of the reference value, whereas the LLOQ should be within 20% [16].

The stability parameter was evaluated for samples in the autosampler (1, 3, and 5 days after storage at 5 °C) and in the short term during preparation (pre- and post-preparation experiments for LQC and HQC). Additionally, the influence of conditions during the long period of loaded VAMS samplers was examined for LQC and HQC (1, 2, 4, 6, and 8 weeks, at RT and 4 °C). The long-term stability was assessed only for the working solutions, and the samples were not tested according to the TDM specifications after preparation. Based on stability, all procedures were repeated six times for each MPA determination method. The stability may be acceptable if the differences are within the $\pm 15\%$ nominal value range [13, 16].

Based on the formulas presented by Taylor et al. and Zhou et al., the matrix effect (ME) was calculated after post-extraction addition experiment testing for six different sources (separately for WB, PL, and VAMS samples, in LQC and HQC levels). Similarly, the process efficacy (PE) and absolute recovery (AR) ratios (expressed as percentages) were evaluated for MPA and IS, including each matrix [15, 17, 18].

According to the comedication, sample inhomogeneity, and metabolite presence, an Incurred Sample Reanalysis (ISR) experiment should be performed for potential differences in observations between calibrators and samples. This experiment used patient samples from separate analytical runs performed on different days. This was repeated twice for each sample [$n = 10$] using the VAMS-LC-MS/MS, PL-LC-MS/MS, and WB-LC-MS/MS methods. The percent difference between the initial concentration value and the reanalysis concentration level should be at most 20% of the mean for at least 67% of repetitions. The differences were calculated using the following formula: (repeat value–initial value)/mean value of both measurements and expressed as a percentage ratio [15, 16].

The hematocrit effect (HE) was evaluated as in our previous TAC study [15]. Thus, assuming that HE caused differences in MPA concentrations observed between WB and VAMS samples, the correlation for differences in HE values was evaluated mathematically.

MPA concentration measurements (Fig. 1, step 1) were analyzed by cross-validation. Paired methods were evaluated using statistical tools (according to EMA guidelines) using Passing-Bablok regression, Bland-Altman plots, correlation,

and predictive performance methods. Differences between the methods were assessed using the Passing-Bablok regression. Two methods were set as equivalent, while 1 was within the 95% CI range for slope and 0 was within the 95% CI range for intercept [19]. Based on EMA guidelines, differences between methods checked with the Bland–Altman plot should be lower than 20% for 67% of the analyzed pairs [16, 20]. Instead, the clinical acceptance criterion for paired sample bias was < 15% for 67% of the analyzed pairs [13]. Correlation between the methods was assessed using Pearson's and intraclass correlation coefficients (ICC). Following the IATDMCT guidelines for predictive performance, the median prediction error (MPE), median percentage prediction error (MPPE), root mean squared prediction error (RMSE), and median absolute percentage prediction error (MAPE) were calculated (the predictive parameters should be lower than 15%) [13, 21]. The above analysis of the results is shown in steps 2 and 3 in Fig. 1.

The results obtained were used in the clinical validation process based on the guidelines of Capiou et al. for DBS validation (Fig. 3, steps 4–6) [13]. MPA concentrations were recalculated using the formula obtained during the cross-validation. The results were analyzed again using the same statistical tools, similar to the cross-validation process.

An independent set of data—the results of MPA determination obtained using prescribed analytical methods—was used for the regression formula validation using the above-mentioned statistical methods.

During the chromatogram analysis and evaluation, LabSolutions software (version 5.97, Shimadzu, Tokyo, Japan) was used for peak marking and calibration curves by linear $1/x$ weighting with the correlation coefficient of the calibration curve (R^2) calculation. MedCalc (version 20.218, MedCalc, Ostend, Belgium) and GraphPad Prism (9.5.1, Boston, MA, USA) were used for graph preparation, cross-validation, and clinical comparison. All data presented in this study are expressed as the arithmetic mean \pm standard deviation (SD) or the coefficient of variation (CV).

Routinely used high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection method (HPLC–DAD) description

The HPLC method using DAD detection was routinely performed in the CMHI for MPA concentration determination in the patients treated with MMF. After MPA extraction from the serum or plasma using the liquid–liquid extraction (LLE) method with methylene chloride and butanol (98:2, v/v) evaporation using nitrogen, the dry residue was dissolved in the mobile phase, and 50 μ L of the sample was injected into a C_{18} column with UV detection at 214 nm. A mixture of acetonitrile and water (36%) was used as the mobile phase at a 1.6 mL/min flow rate; retention time

values were 5 and 7 min (for MPA and IS, respectively), and a total run time of 10 min. Oxazepam was used as the structurally unrelated internal standard (URIS). The results were calculated using the F-factor, set at 2.6 (as the MPA-to-IS peak area ratio). The Pharmacokinetics Laboratory of CMHI regularly participated in the LGC Group (Laboratory of the Government Chemist, Teddington, UK) immunosuppressant proficiency scheme (the therapeutic reference range was successfully calibrated in each round and set at 1.0–3.5 μ g/mL).

Results

Method development

Under the established chromatographic conditions, the run time was set as 10 min, and the retention time values for the analytes were determined (see chromatograms in Supplementary File–Sect. 4). MPAG was used only for co-elution and MS source-detector optimization in the presented experiments. According to the potential MPAG in-source dissociation to MPA, the MS working conditions were set experimentally based on the ratio between the MPAG and MPA peaks and the in-source product of the dissociation peak [22]. Additionally, MPAG and MPA were separated chromatographically. Different solutions were tested for extraction optimization: pure methanol or acetonitrile and their mixtures with water and purified water. According to our previous study, pure water is the best solvent for MPA extraction from VAMS. Based on our experience, the precipitation mixture is optimal for all analyte extractions from the VAMS tip [15]. The drying time was optimal during the 1 h cycle. LC–MS/MS methods for all matrices were established using the chromatographic and apparatus conditions described above. As organic mobile phases, mixtures of acetonitrile and methanol (50:50) and pure methanol, with formic acid and ammonium formate or ammonium fluoride addition, were tested. The optimal mobile phase was methanol with formic acid and ammonium fluoride addition, based on the experiments. Ammonium fluoride was added to the mobile phase for appropriate monitoring of MPAG according to the peak height, which was experimentally optimised. For chromatographic separation, different columns were tested: Zorbax Eclipse Plus- C_{18} (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m; Agilent, Santa Clara, CA, USA), Kinetex- C_{18} (4.6 \times 100 mm, 2.6 μ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA), Hypurity- C_{18} (50 \times 2.10 mm, 3 μ m; ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and mentioned above—Poroshell. Only the latter method ensured appropriate separation and optimal retention times.

Representative chromatograms of the blank sample, HQC, and LQC calibrators are presented in the Supplementary File (Sect. 4).

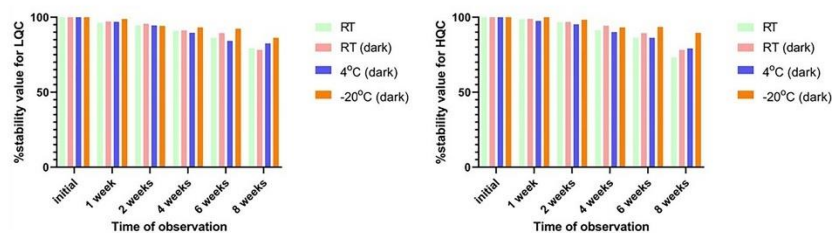


Fig. 2 Evaluation of VAMS stability under different conditions [$n=4$]. The stability was evaluated using two calibration levels of mycophenolic acid—LQC and HQC (0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) in different storage conditions (at RT with access to light and in the dark, and at 4 $^{\circ}\text{C}$ and -20°C , both in the dark). The analyte in the VAMS sampler was stable during the six weeks

in all storage places at both calibration levels. Stability is expressed as a percentage ratio to initial stability (100%), RT room temperature, RT (dark) room temperature in the dark condition, LQC lower quality control concentration, HQC higher quality control concentration, VAMS volumetric absorptive microsampling

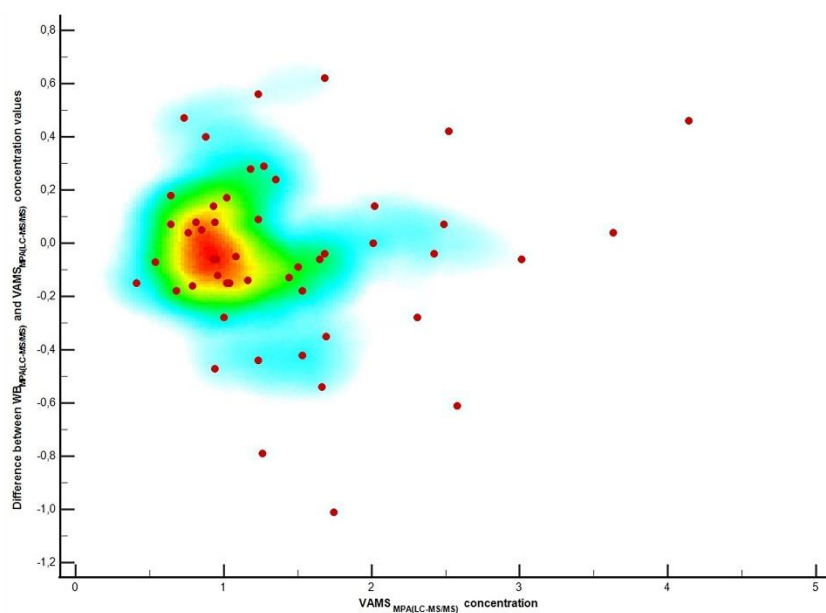


Fig. 3 Scatter diagram showing the effect of the hematocrit (presented as cold/hot map of correlation between $WB_{MPA(LC-MS/MS)}$ and $VAMS_{MPA(LC-MS/MS)}$ concentrations differences). The correlation coefficient of the presented data was lower than zero (-0.02596 , -0.31717 to 0.2696 for 95% CI), confirming that HT level does not influence analyte recovery from the VAMS sampler.

$WB_{MPA(LC-MS/MS)}$ MPA concentration in whole blood measured using tandem-mass liquid-chromatography analytical method (without correction), $VAMS_{MPA(LC-MS/MS)}$ MPA concentration in volumetric absorptive micro sample measured using tandem-mass liquid-chromatography analytical method (without correction), HT hematocrit level, VAMS volumetric absorptive microsampling

Validation of methods for MPA determination in whole blood, plasma, and volumetric-absorptive microsampling samples

The LC–MS/MS methods for WB and PL were validated in the 0.10–15 µg/mL calibration range, using MPA-d₃ as the IS.

Whole blood and plasma

In both matrices, linearity was assessed based on ten calibration curves using linear $1/x$ weighting. The summarized mean R^2 was 0.9984 ± 0.0013 , and the mean calibration equation was $y = 0.9821x + 0.011$ for WB and 0.9994 ± 0.0013 and $y = 1.004x - 0.037$ for PL. A calibration curve was constructed using seven concentration levels, with zero and blank samples. Signal-to-noise ratio (S/N) was used for LLOQ experimentally establishment—0.10 µg/mL in WB and PL. Chromatograms were analyzed according to interferences caused by unknown or endogenous substances from the matrix (lower than 15% of 0.10 µg/mL in both methods). The precision and accuracy of MPA concentrations for both matrices at the LQC, MQC, and HQC were within the EMA and IATDMCT acceptance ranges (accuracy within 85–115%, imprecision less than 15%, and less than 20% for LQC, and CV < 10% respectively) [7, 13, 16]. The carry-over effect was insignificant and fulfilled the EMA criteria for MPA and IS ($0.9838 \pm 0.4157\%$ and $0.223 \pm 0.082\%$, respectively) [15]. Similarly, the plasma carry-over effect was insignificant for MPA and IS ($0.823 \pm 0.452\%$ and $0.268 \pm 0.018\%$, respectively). WB and PL samples were stable at 5 °C for LQC and HQC in the autosampler ($n = 6$; initial day 1–3 and after the 5-day checkpoint), fulfilled the acceptance criteria, were satisfactory, and were stable before and after extraction [$n = 6$; for LQC and HQC]. The ME, AR, and PE were calculated after the pre- and post-extraction experiments. The above parameters characterized the matrix effects in the WB, and the PL fulfilled the EMA acceptance criteria [16]. For the ISR experiment, the %-difference between pairs of the sample was lower than 20% for 80% of WB samples (mean: -4.07 ± 4.85) and 70% of PL samples (mean: -6.68 ± 7.15). The summarized validation results are presented in the Supplementary File (Sect. 5).

Volumetric-absorptive microsampling samples (VAMS)

Linearity was assessed based on 10 calibration curves (each with seven concentration levels, with zero and blank samples) using linear $1/x$ weighting; the summarized mean R^2 was 0.998 ± 0.001 , and the calibration equation was $y = 0.9678x - 0.005$. In this case, signal-to-noise ratio (S/N) was also used for LLOQ experimentally establishment—0.10 µg/mL. Unknown or endogenous substances did

not interfere in assays (lower than 15% of 0.10 µg/mL). The precision and accuracy evaluation results of MPA concentrations at the LQC, MQC, and HQC were within the EMA and IATDMCT acceptance ranges (accuracy within 85–115%, imprecision less than 15% and less than 20% for LQC, and CV < 10% respectively) [7, 13, 16]. The carry-over effect was insignificant and fulfilled the EMA criteria for MPA and IS ($0.5070 \pm 0.1236\%$ and $0.1600 \pm 0.041\%$, respectively) [15]. Stability at 5 °C for LQC and HQC in the autosampler ($n = 6$; initial day 1–3 and after 5-day checkpoint) fulfilled the acceptance criteria and was satisfactory, as well as stability before and after extraction [$n = 6$; for LQC and HQC]. The ME, AR, and PE were calculated after the pre- and post-extraction experiments. The parameters characterized by matrix effects fulfilled the EMA acceptance criteria [15]. The summarized validation results are presented in the Supplementary File (Sect. 5).

Loaded VAMS sampler stability was evaluated for LQC and HQC under different storage conditions (at RT in the dark, at RT with access to light, and at 4 °C and -20 °C, both at night) with a variable time of observation (1, 2, 4, 6, and 8 weeks). The analyte was stable at both concentrations during six weeks of storage at RT and 4 °C (both in the dark). Only in the case of freezing (-20 °C) VAMS was stable during the observation period (8 weeks). The results of the stability tests are shown in Fig. 2.

The effect of HT was evaluated for each patient included in the study. The Pearson correlation coefficient was -0.02596 (-0.3171 to 0.2696 , 95% CI), confirming that no correlation was observed in this case. The results are presented as a scatter diagram in Fig. 3.

For the ISR experiment, the % difference between pairs of samples was lower than 20% for 80% of samples (mean: -10.73 ± 6.86) and consequently fulfilled EMA acceptance criteria [13, 16].

Patient's clinical data

An overview of the patient's demographic data is presented in the Supplementary File (Sect. 6).

Clinical and cross-validation

The quality of the VAMS samples was satisfactory (only two tips were excluded from the study because of the unloading of capillary blood). Clinical and cross-validation were based on 150 samples (three samples from each patient included in the study: WB, PL, and VAMS concentrations). A summary of the cross-validation process is provided in Fig. 4 as regression and Bland–Altman graphs. The data from the statistical analysis of the paired compared methods are shown in Table 2.

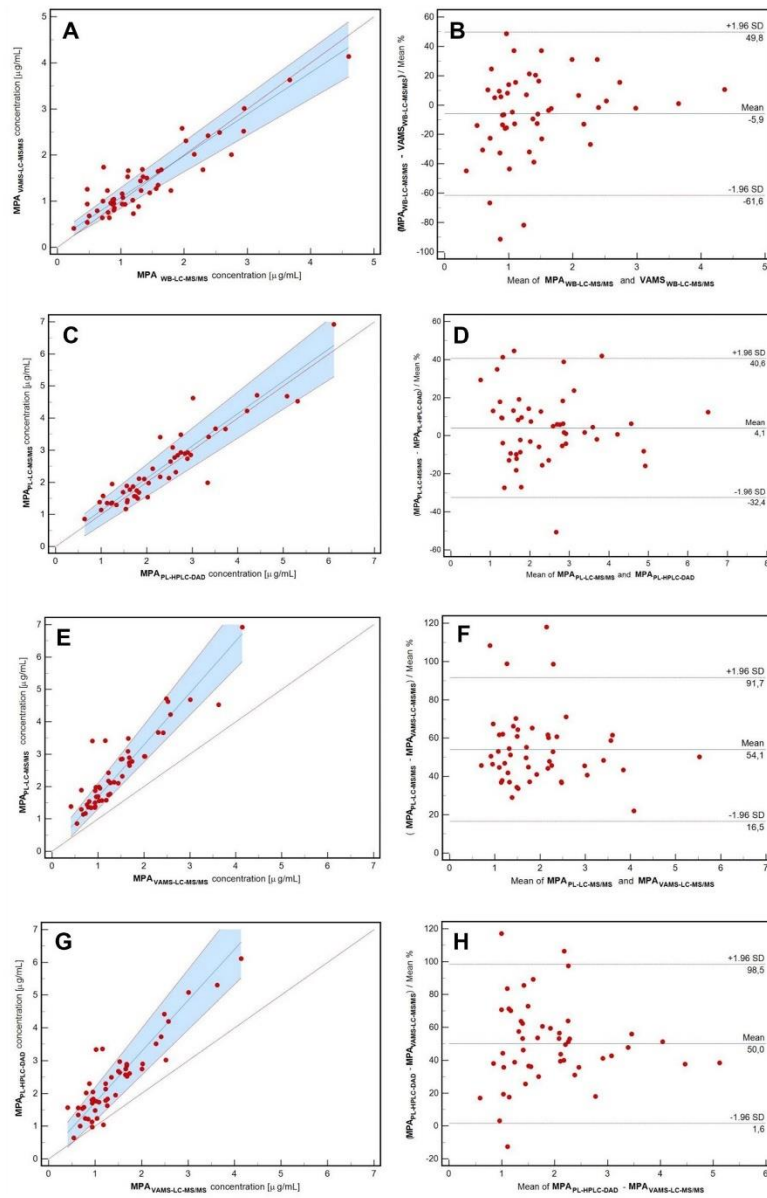


Fig. 4 Passing-Bablok regression curves (a, c, e, g) and Bland-Altman plots (b, d, f, h) for cross-validation of the methods before conversion using hematocrit and regression formulas. Compared methods are described on the axis in each presented case. Data are presented as red circle points for all paired samples. The regression line, diagonal line, and confidence interval curve are presented as blue, red dotted, and blue area, respectively, on Passing-Bablok regression curves (a, c, e, g). The limit of agreement and the average difference are presented in red dotted lines and blue line, respectively, on Bland-Altman plots (b, d, f, h). In contrast, average bias is presented as a percent value with $\pm 1.96SD$ range. VAMS volumetric absorptive microsampling, LC-MS/MS liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-DAD high-performance liquid chromatography with diode array detection, $MPA_{VAMS-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in VAMS sample determined LC-MS/MS, $MPA_{WB-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in whole blood sample determined LC-MS/MS, $MPA_{PL-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined LC-MS/MS, $MPA_{PL-HPLC-DAD}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined HPLC-DAD

Passing-Bablok regression demonstrated equivalence between VAMS-LC-MS/MS and WB-LC-MS/MS (Fig. 4a and Table 2). The Bland-Altman plot describes the mean bias for the paired methods shown in Fig. 4b. The mean difference in the case of WB/VAMS revealed that the methods were acceptable according to EMA acceptance criteria (<20%) but not in the case of IATDMCT criteria (<15%). The WB method for MPA determination has been validated to check the equivalence between concentrations in WB and VAMS samples [7, 13, 16]. Parameters characterized by predictive performance fulfilled the IATDMCT criteria in the case of VAMS-LC-MS/MS and WB-LC-MS/MS method confirmation; the values were lower than 15%.

Interchangeability has also been confirmed for paired results from routinely used HPLC-DAD and reference LC-MS/MS methods (regression: $y = 1.01x + 0.11$; slope: 1.01, 0.91 to 1.13; intercept: 0.11, -0.24 to 0.30, 95% CI; see Fig. 4c). The mean bias based on the Bland-Altman plot fulfilled the EMA and IATDMCT criteria (Fig. 4d) [12, 15]. High correlation factors were also observed: 0.93 and 0.96 (Pearson and ICC). The predictive performance ratio was < 15%.

To establish the correction formula, the VAMS/PL MPA concentration was recalculated according to two approaches: regression Eq. (1) or formula with HT (2) [13]:

The correction formula : $y = 1.60x + 0.08$ (where $y = C_{MPA}$ in PL and $x = C_{MPA}$ in VAMS) is presented in Fig. 4e (1)

Regression equation (corrected $MPA_{VAMS_c}/MPA_{PLASMA}$): $y = x - 0.01$ (slope: 1.00, 0.90, 1.11, 95% CI; intercept: -0.01, -0.27 to 0.19, 95% CI), is presented in Fig. 5a.

Bland-Altman plot—mean bias: 4.76% (-1.11 to 10.64, 95% CI) - 86% of paired samples fulfilled EMA criteria (<20%), while 72% of paired samples fulfilled the

IATDMCT criteria (<15%), presented in Figures: 4f (before conversion) and 5b (after conversion).

Predictive performance: MPPE, MAPE, and RMSE were lower than 15% (mean values: 9.20%, 13.38%, and 12.21%, respectively). Paired results were highly correlated.

Correction formula : $C_{VAMS-MPA}/[1 - HCT \text{ level}] = C_{PL-MPA}$ (2)

The regression equation (corrected $C_{MPA_{HT}}/C_{MPA_{PLASMA}}$): $y = x - 0.13$ (slope: 1.00, 0.92-1.09, 95% CI; intercept: -0.13, -0.35 and 0.03, 95% CI) is presented in Fig. 5c.

Bland-Altman plot mean bias: +10.90% (5.24 to 16.56, 95% CI) - 88% of paired samples fulfilled the EMA criteria (<20%), whereas 78% of paired samples fulfilled the IATDMCT criteria (<15%) (Fig. 5d).

Predictive performance MPPE, MAPE, and RMSE were lower than 15% (mean values: 7.03%, 14.02%, and 12.14%, respectively). Paired results were highly correlated.

The results were statistically similar to the PL concentration obtained from the formula with HT. Therefore, the regression formula above was used for the calculations.

Because the HPLC-DAD method is still used for routine monitoring of MPA in the CMHI, cross-correlation and clinical validation were also performed between the VAMS and HPLC-DAD paired samples. However, statistical analysis denied interchangeability between VAMS-LC-MS/MS and HPLC-DAD methods (see Figs. 4g and h); the obtained regression formula was used for VAMS results conversion to MPA therapeutic range based on HPLC-DAD (statistical details shown in Table 2). The converted VAMS results using the prescribed formula fulfilled almost all requirements during clinical validation, except for the MAPE prediction factor (see Figs. 5e, f, and Table 2).

The results of MPA determination in an independent group of patients [$n = 30$] (not included in the above-described cross- and clinical validation) were compared using statistical tools used for method comparison. When the VAMS-LC-MS/MS analysis results were recalculated using the regression formula and compared in the next step with the PL-LC-MS/MS results, they entirely fulfilled the acceptance criteria. Pearson's correlation coefficient equals 0.99 (0.96-0.99; 95% CI), while the slope was set at -0.03

(ranging from -0.54 to 0.06), and the intercept was set at 0.98 (ranging from 0.80 to 1.29). The mean percentage bias was calculated as -0.80% (ranging from -4.80 to 4.64), and more than 67% of paired samples fulfilled EMA (preference <20%) as well as IATDMCT (preference <15%)

Table 2 Cross-validation and clinical validation results—before and after conversion using recalculating formulas (based on: individual hematocrit level and validated Passing-Bablok regression model)

Statistic	Before conversion (cross-validation)		After conversion (clinical validation)	
	MPA _{VAMS} LC-MS/MS vs MPA _{PL} LC-MS/MS	MPA _{VAMS} LC-MS/MS vs MPA _{PL} HPLC-DAD	MPA _{VAMS} LC-MS/MS vs MPA _{PL} LC-MS/MS	MPA _{VAMS} LC-MS/MS vs MPA _{PL} HPLC-DAD
Passing-Bablok analysis (regression formula)				
Passing-Bablok-regression formula	$C_{VAMS} = 0.90 C_{WB} + 0.17$	$C_{PL} = 1.01 C_{PL} + 0.11$	$C_{PL} = 1.60 C_{VAMS} + 0.08$	$C_{HPLC} = 1.56 C_{PL} + 0.17$
Intercept (A)	0.17 (-0.06 to 0.29)	0.11 (-0.24 to 0.30)	0.08 (-0.14 to 0.29)	0.17 (-0.22 to 0.38)
Slope (B)	0.90 (0.79–1.00)	1.01 (0.91–1.13)	1.60 (1.44–1.80)	1.56 (1.38–1.78)
Bland-Altman bias analysis (based on plot and %-differences bias)				
%-mean difference bias	-6.80%	+4.08%	54.07%	50.00%
(-1.96SD; +1.96SD)	(-61.50 to 47.90%)	(-12.1 to 9.37%)	(48.62–59.53%)	(1.60–98.50%)
% of paired samples fulfilled the EMA criteria (< 20%)	70%	12%	0%	12%
% of paired samples fulfilled the IATDMCT criteria (< 15%)	60%	6%	0%	4%
Predictive analysis performance factors				
MPE	-0.05	-0.12	-0.92	-0.81
MPPe [%]	-5.50	1.90	85.00	67.54
RMSE [%]	15.00	12.00	92.00	81.54
MAPE [%]	13.69	8.25	66.65	62.42
Correlation coefficients				
Pearson's (R ²)	0.92 (0.87–0.96; 95% CI)	0.93 (0.88–0.96; 95% CI)	0.92 (0.86–0.95; 95% CI)	0.90 (0.84–0.95; 95% CI)
Spearman (SRCC)	0.81 (0.68–0.89; 95% CI)	0.92 (0.86–0.95; 95% CI)	0.88 (0.80–0.93; 95% CI)	0.83 (0.73–0.90; 95% CI)
Intraclass (ICC)	0.91 (0.85–0.95; 95% CI)	0.96 (0.93–0.98; 95% CI)	0.84 (0.73–0.90; 95% CI)	0.83 (0.74–0.91; 95% CI)

Data are presented as mean with range and confidence interval (95% CI)

VAMS volumetric absorptive microsampling, LC-MS/MS liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-DAD high-performance liquid chromatography with diode array detection, MPA_{VAMS} LC-MS/MS mycophenolic acid concentration in VAMS sample determined LC-MS/MS, MPA_{PL} LC-MS/MS mycophenolic acid concentration in whole blood sample determined LC-MS/MS, MPA_{PL} LC-MS/MS mycophenolic acid concentration in plasma sample determined LC-MS/MS, MPA_{PL} HPLC-DAD mycophenolic acid concentration in plasma sample determined HPLC-DAD, MPA_{VAMS} HPLC-DAD mycophenolic acid concentration corrected with hematocrit, MPA_{VAMS} LC-MS/MS mycophenolic acid concentration corrected with regression, MPA_{VAMS} DAD LC-MS/MS mycophenolic acid concentration corrected with regression, IATDMCT International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, EMA European Medicines Agency, MPE median prediction error, MPPe median percentage prediction error, RMSE root mean squared prediction error, MAPE median absolute percentage prediction error, R² Pearson's correlation, SRCC Spearman rank correlation coefficient, ICC Intraclass correlation coefficient

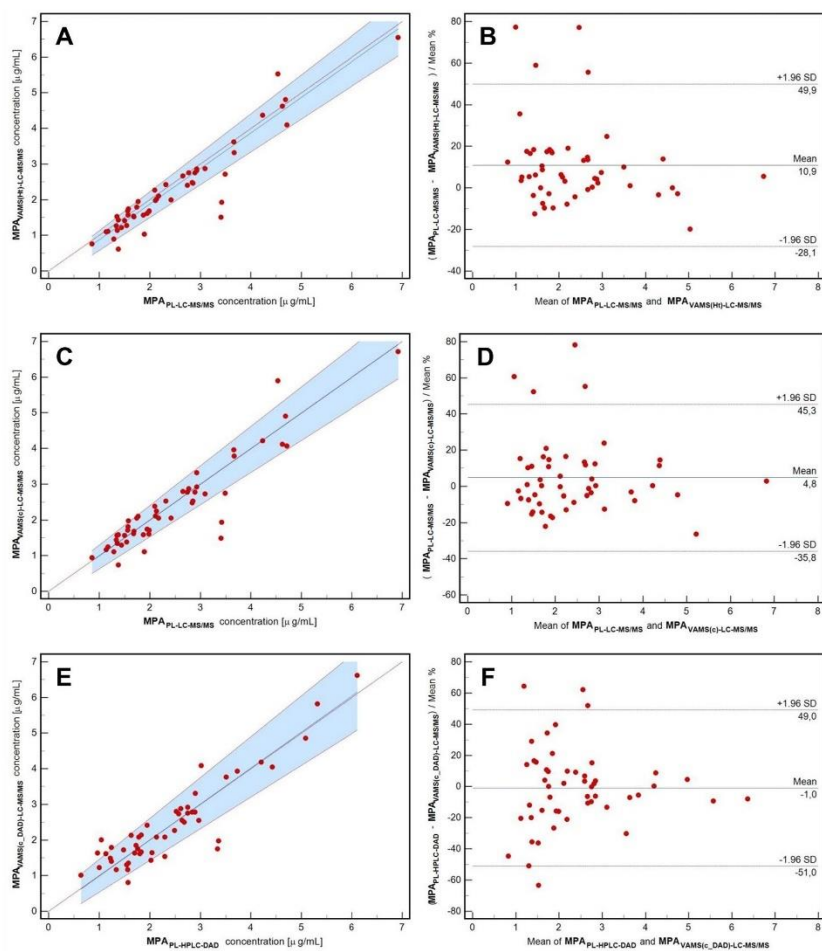


Fig. 5 Passing-Bablok regression curves (a, c, e) and Bland-Altman plots (b, d, f) for clinical validation of the methods after conversion before conversion using hematocrit and regression formulas. Compared methods are described on the axis in each presented case. Data are presented as red circle points for all paired samples. The regression line, diagonal line, and confidence interval curve are presented as blue, red dotted, and blue area, respectively, on Passing-Bablok regression curves (a, c, e). The limit of agreement and the average difference are presented in red dotted lines and blue line, respectively, on Bland-Altman plots (b, d, f). In contrast, average bias is presented as a percent value with ± 1.96 SD range. *VAMS* volumetric absorptive microsampling, *LC-MS/MS* liquid chroma-

tography-tandem mass spectrometry, *HPLC-DAD* high-performance liquid chromatography with diode array detection, $MPA_{VAMS-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in VAMS sample determined LC-MS/MS, $MPA_{WB-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in whole blood sample determined LC-MS/MS, $MPA_{PL-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined LC-MS/MS, $MPA_{PL-HPLC-DAD}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined HPLC-DAD, $MPA_{VAMSH-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration corrected with hematocrit, $MPA_{VAMSc-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration corrected with regression, $MPA_{VAMSc-DAD-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration corrected with regression

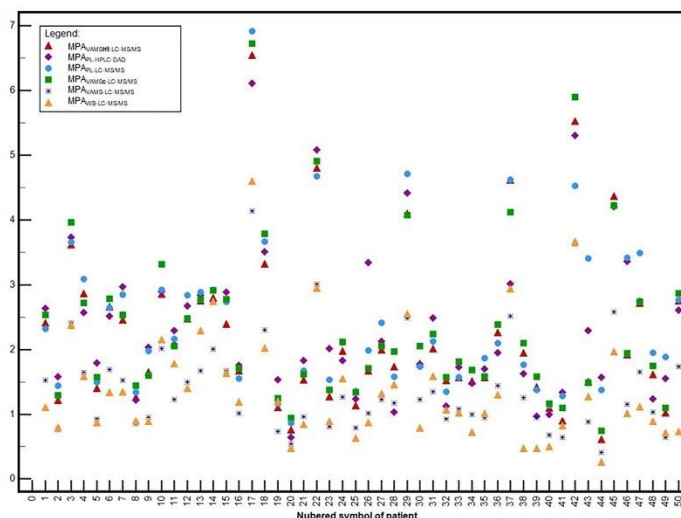


Fig. 6 MPA determination results using different methods for each pediatric patient after renal transplantation—presented diagram included concentrations before and after conversion using formulas based on hematocrit value and Passing-Bablok regression model [$n = 50$]. The patient's blinded numbers were assigned randomly. The meaning of using points, shapes, and colors is described in the legend on the graph. $MPA_{VAMSH-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration corrected with hematocrit, $MPA_{PL-HPLC-DAD}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined HPLC-DAD, $MPA_{PL-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in plasma sample determined LC-MS/MS, $MPA_{VAMS-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration corrected with regression, $MPA_{VAMS-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in VAMS sample determined LC-MS/MS, $MPA_{WB-LC-MS/MS}$ mycophenolic acid concentration in whole blood sample determined LC-MS/MS, $VAMS$ volumetric absorptive micro-sampling

acceptance criteria. The predictive performance ratio was $< 15\%$.

The summarized results of the MPA measurements obtained using different sampling techniques and analytical methods are shown on a multi-point graph (Fig. 6). A table presenting the results of the MPA determination is provided in the Supplementary file (Sect. 7). For each patient, including the clinical validation.

Discussion

This study presented successfully validated methods of MPA quantification in PL, WB, and VAMS capillary blood. In addition to the analytical aspect of method development, cross-validation, and clinical validation were performed in the pediatric population after renal transplantation. We developed a method for MPA determination in WB but only compared the MPA levels. The MPA levels in the WB and VAMS samples were notably lower than those in the PL. Therefore, the results should be interpreted carefully, and

a new therapeutic range is required. The MPA concentration was lower in WB than in PL because of the dilution effect in WB [23, 24]. On the other hand, a more straightforward approach is based on MPA concentration conversion from WB to PL levels based on previously validated conversion formulas, as in the present study. However, only this approach allowed for comparing MPA concentrations in VAMS-based capillary blood and WB.

The main reasons for MPA monitoring are inter- and intra-individual dose/exposure relationships, adverse effects, and confounding factors such as food-drug interactions [1–4]. In the pediatric population, close monitoring of MPA is essential for recognizing and evaluating adherence to therapy. Clinical validation of the method after analytical validation is necessary to ensure the reliability of the results. Only five studies have described clinical proof of MPA determination using VAMS [24–28]. Previously published studies have been performed in adult liver or renal transplant recipients. The relative differences in the corrected MPA concentrations evaluated by Paniagua-Gonzalez in the two studies were -3.95% and 2.04% , respectively, while 95% and 75% of paired samples were within the acceptance bias

range ($\pm 20\%$) [24, 25]. Zwart et al. qualified 17.7% of the paired samples within the mentioned range and 84.4% after correction using a regression equation [26]. The relative difference evaluated using the Bland–Altman plot was equal to 7%. In this study, samples were collected at pre-dose (C_0) and post-dose concentrations (C_1, C_2, C_3 ; 1, 2, 3 h after drug administration, respectively) [26]. In other studies, paired time points were collected (before and after drug dosage) or only for trough concentration measurements (as in the present study). In a study by Wang et al., the mean bias was -1.5% and more than 85% of paired samples fulfilled the EMA and clinical acceptance criteria (± 20 and 15%, respectively, for 67% of paired samples) [16, 27]. In the latest study, average bias and MAPE were -5.3% and 9.50%, respectively, which fulfilled established criteria. Similar to our research, the ISR experimental results fulfilled the EMA criteria (84% of samples met the acceptance criteria) [28].

Recently published a comprehensive review of VAMS, graded assays according to their clinical utility, and applications for further studies [14]. Almost all published methods for MPA quantification have qualified into the category characterized as suitable for clinical use (negligible HT Effect, good cross-validation results, and high recovery values), which proved relatively high usability for TDM [14].

Following the study by Koster et al. MPA concentrations in VAMS samplers may be considered stable at RT, 37 °C, and -20 °C for 60, 30, and 50 days, respectively [23]. Similar results were obtained in Paniagua-Gonzales study [24, 25]. Wang et al. reported a deviation of less than 15% for MPA concentration after storage at 4 °C, whereas it was higher for VAMS stored at RT. In our study, MPA was stable at RT and 4 °C in VAMS for approximately 42 days. Preferably, the tips should be kept at RT in the dark to achieve higher stability. The limited stability of MPAG may cause its overestimation during long-term storage.

Our study showed the interchangeability of HPLC–DAD and LC–MS/MS methods owing to satisfactory regression parameters in the tested calibration range. However, these methods are similar; the higher sensitivity and selectivity of the LC–MS/MS method are considered the main benefits. Based on the variable calibration range, LC–MS/MS is the method of choice for simultaneous determination with other immunosuppressants [7, 23]. In this study, clinical validation of the regression formula was successful, in contrast to previously published studies [24–28]. However, the prescribed conversion may have been performed in an independent sample (not included in the validation). Still, on the other hand, more data for multi-center validation between groups and confirmation of the prescribed formula should be performed in the case of different specific samples.

The present study has some limitations. First, the pediatric population included in the study was relatively large;

however, samples were obtained only once for trough concentration measurements. It should be noted that the validated method concentration range was established directly according to the trough concentration measurements. One of the main limitations of VAMS-based immunosuppressant determination is the limited access to proficiency testing schemes (PT). High interlaboratory variability (ranging from 13.2% to 18.2% for TAC and other immunosuppressants), concluded by Veenhof et al. in a pilot PT of immunosuppressants in VAMS, confirmed that standardization and external harmonization are strictly needed [29].

Conclusions

The developed and fully validated methods were successfully applied to MPA measurements in VAMS samples, PL, and WB. The VAMS strategy is strictly beneficial owing to limited access to pediatric transplant clinics and experience with the SARS-CoV-2 pandemic restrictions. Furthermore, the method developed in this study can be used to monitor adherence to immunosuppressive therapy. To the best of our knowledge, this is the first LC–MS/MS method used for MPA determination in VAMS samples obtained from a pediatric population. The successful clinical validation of the conversion formula-based regression model is a primary contributor to the literature and VAMS implementation for MPA measurements in the pediatric population, which has not been described previously in the literature.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00509-w>.

Acknowledgements Special acknowledgements should be given to pediatric patients who voluntarily participated in the study and their parents or legal guardians. The authors thank Krystyna Szymańska and Ewa Wojtkowska for their technical assistance during the sample preparation and routine HPLC–DAD performance. We also thank the medical staff from the Children Memorial Health Institute in Warsaw, who were involved in the sample collection, and Katarzyna Broniec for her language support and remarks.

Author contribution AK: conceptualization, methodology, validation, investigation, writing—original draft, data curation, writing—review and editing, visualization; JR: data curation, visualization; PC: data curation, validation; AC: investigation, data curation. DM: supervision; MS: investigation; MG: investigation; TP: conceptualization, writing—review and editing, visualization, management.

Data availability All data supporting the findings of this study are available in the paper and its Supplementary Information. Detailed references to the individual supplementary files are provided in the manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest. All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial or non-financial interests in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Ethical approval This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the International Council for Harmonization Guidance for Good Clinical Practice. This study was approved by the Bioethics Committee of the Children's Memorial Health Institute in Warsaw (approval number and date: 36/KBE/2022, 19 October 2022).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, Johnson-Davis KL, Kunicki PK, Lemaitre F, et al. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2021;43(2):150–200.
- Ehren R, Schijvens AM, Hackl A, Schreuder MF, Weber LT. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in pediatric patients: novel techniques and current opinion. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020;17(2):201–13.
- Labriffe M, Micallef L, Woillard JB, Monchaud C, Saint-Marcoux F, Debord J, et al. Mycophenolate Mofetil Dose Adjustment in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *Ther Drug Monit.* 2023; Publish Ahead of Print.
- Dasgupta A. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid. *Adv Clin Chem.* 2016;76:165–84.
- Hocker B, van Gelder T, Martin-Govantes J, Machado P, Tedesco H, Rubik J, et al. Comparison of MMF efficacy and safety in paediatric vs adult renal transplantation: subgroup analysis of the randomised, multicentre FDCC trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;26(3):1073–9.
- Filler G, Todorova EK, Bax K, Alvarez-Elías AC, Huang SHS, Kobrzynski MC. Minimum mycophenolic acid levels are associated with donor-specific antibody formation. *Pediatr Transplant.* 2015;20(1):34–8.
- Seger C, Shipkova M, Christians U, Billaud EM, Wang P, Holt DW, et al. Assuring the proper analytical performance of measurement procedures for immunosuppressive drug concentrations in clinical practice. *Ther Drug Monit.* 2016;38(2):170–89.
- Łuszczynska P, Pawiński T, Kunicki PK, Sikorska K, Marszałek R. Free mycophenolic acid determination in human plasma ultrafiltrate by a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Biomed Chromatogr.* 2017;31(10):e3976.
- Denniff P, Spooner N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Anal Chem.* 2014;86(16):8489–95.
- Kocur A, Pawiński T. Volumetric absorptive microsampling in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs— from sampling and analytical issues to clinical application. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):681.
- Leino AD, Takyi-Williams J, Pai MP. Volumetric Absorptive Microsampling to Enhance the Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus and Mycophenolic Acid: A Systematic Review and Critical Assessment. *Ther Drug Monit.* 2023; Publish Ahead of Print.
- Capiou S, Stove C. Hematocrit prediction in volumetric absorptive microsamples. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;190(25):113491.
- Capiou S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, et al. Official international association for therapeutic drug monitoring and clinical toxicology guideline. *Ther Drug Monit.* 2019;41(4):409–30.
- Dodeja P, Giannoutsos S, Caritis S, Venkataraman R. Applications of Volumetric Absorptive Microsampling Technique: A Systematic Critical Review. *Ther Drug Monit.* 2023; Publish Ahead of Print.
- Kocur A, Marszałek D, Rubik J, Czajkowska A, Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus based on volumetric absorptive microsampling technique (VAMS) in renal transplant, pediatric recipients—LC-MS/MS method development, hematocrit effect evaluation, and clinical application. *Pharmaceutics.* 2023;15(1):299.
- European Medicines Agency information page. EMA. ICH M10 on bioanalytical method validation—scientific guideline 2019. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed 5 July 2023
- Zhou W, Yang S, Wang PG. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis.* 2017;9(23):1839–44.
- Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2005;38(4):328–34.
- Bilic-Zulle L. Comparison of methods: passing and Bablok regression. *Biochem Med.* 2011;21(1):49–52.
- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med.* 2015;25(2):141–51.
- Biswas SS, Bindra M, Jain V, Gokhale P. Evaluation of imprecision, bias and total error of clinical chemistry analysers. *Indian J Clin Biochem.* 2014;30(1):104–8.
- Ceglarek U, Casetta B, Lembcke J, Baumann S, Fiedler GM, Thiery J. Inclusion of MPA and in a rapid multi-drug LC–tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of immunosuppressants. *Clin Chim Acta.* 2006;373(1–2):168–71.
- Koster RA, Niemeijer P, Veenhof H, van Hateren K, Alffenaar JWC, Touw DJ. A volumetric absorptive microsampling LC–MS/MS method for five immunosuppressants and their hematocrit effects. *Bioanalysis.* 2019;11(6):495–508.
- Paniagua-González L, Lendoiro E, Otero-Antón E, López-Rivadulla M, de Castro-Ríos A, Cruz A. Comparison of conventional dried blood spots and volumetric absorptive microsampling for tacrolimus and mycophenolic acid determination. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;208(208):114443.
- Paniagua-González L, Díaz-Louzao C, Lendoiro E, Otero-Antón E, Cadarso-Suárez C, López-Rivadulla M, et al. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by LC–MS/MS using a novel atmospheric pressure ionization probe (UniSpray™). *J Pharm Biomed Anal.* 2020;189(10):113422.

26. Zwart TC, Metscher E, van der Boog PJM, Swen JJ, de Fijter JW, Guchelaar H, et al. Volumetric microsampling for simultaneous remote immunosuppressant and kidney function monitoring in outpatient kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2022;88(11):4854–69.
27. Wang X, Dai X, Wan S, Fan Y, Wu L, Xu H, et al. A volumetric absorptive microsampling UPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of tacrolimus, mycophenolic acid and creatinine in whole blood of renal transplant recipients. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2547.
28. Scuderi C, Parker S, Jacks M, John GT, McWhinney B, Ungerer J, et al. Fingerprick microsampling methods can replace venipuncture for simultaneous therapeutic drug monitoring of tacrolimus, mycophenolic acid, and prednisolone concentrations in adult kidney transplant patients. *Ther Drug Monit*. 2023;45(1):69–78.
29. Veenhof H, Koster RA, Junier LAT, Zweipfenning P, Touw DJ. Results from a proficiency testing pilot for immunosuppressant microsampling assays. *Ther Drug Monit*. 2023;45(1):61–8.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Arkadiusz Kocur^{1,2} · Jacek Rubik³ · Paweł Czarnowski⁴ · Agnieszka Czajkowska² · Dorota Marszałek¹ · Maciej Sierakowski⁵ · Marta Górska² · Tomasz Pawiński¹

✉ Arkadiusz Kocur
arkadiusz.kocur@wum.edu.pl

¹ Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St, 02-091 Warsaw, Poland

² Pharmacokinetics Laboratory, Department of Biochemistry, Radioimmunology, and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

³ Department of Nephrology, Kidney Transplantation, and Arterial Hypertension, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

⁴ Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland

⁵ Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University, 1/3 Kazimierza Wóycickiego St, 01-938 Warsaw, Poland

SUPPLEMENTARY FILE

Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients – ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application

Arkadiusz Kocur^{1,2*}, Jacek Rubik^{3#}, Paweł Czarnowski^{4#}, Agnieszka Czajkowska^{2#}, Dorota Marszałek¹, Maciej Sierakowski⁵, Marta Górską², Tomasz Pawiński¹

[#]JR, PC, and AC contributed equally to this work.

ORCID: **AK** 0000-0002-4833-8532, **PC** 0000-0002-3418-1837, **JR** 0000-0002-3392-2154, **AC** 0000-0003-0199-5751, **DM** 0000-0002-3189-5439, **MS** 0000-0003-3770-2762, **TP** 0000-0001-9110-4312

¹ Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-091 Warsaw, Poland;

² Pharmacokinetics Laboratory, Department of Biochemistry, Radioimmunology, and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland.

³ Department of Nephrology, Kidney Transplantation, and Arterial Hypertension, The Children's Memorial Health Institute, Dzieci Polskich 20, 04-730, Warsaw, Poland

⁴ Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Roentgena 5, 02-781 Warsaw, Poland

⁵ Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, 1/3 Kazimierza Wóycickiego St., 01-938 Warsaw, Poland.

***Corresponding:** Arkadiusz Kocur, Department of Drug Chemistry, Medical University of Warsaw, 1 Banacha St., 02-091 Warsaw, Poland; tel. (+48 22) 57 20 630; fax. (+48 22) 57 20 697; e-mail: arkadiusz.kocur@wum.edu.pl

Running head:

Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients

1. Materials

The standard reference MPA (chemical purity $\geq 98.00\%$) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), whereas its SIL-IS (stable-isotope-labeled internal-standard), MPA-d₃ (88.00% chemical purity, 99.10% isotopic purity) was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). The standard for MPAG monitoring in the LC-MS/MS assay was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). LC-MS purity-grade solvents (acetonitrile and methanol) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Reagents for mobile phase preparation, such as ammonium fluoride ($>99.99\%$ chemical purity) and formic acid for LC-MS ($>99.99\%$ chemical purity), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $>99.00\%$ purity) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Appropriate water purity was systematically achieved using a DL2-400 Polwater system (Labopol-Polwater, Kraków, Poland).

Fresh whole blood (WB) and plasma (PL) for method validation were systematically obtained from healthy donors untreated with immunosuppressive drugs (TAC and MPA) at the Regional Centre of Blood Donation and Hemotherapy (Warsaw, Poland). Blood was stored at 4°C, while plasma was frozen at -20°C and used to prepare calibration curves for one or four weeks, respectively.

The above reference and internal standards were stored at -20°C in a freezer to maintain appropriate stability. Other chemical substances and reagents, such as the liquids used for mobile phase preparation, analyte extraction, and protein precipitation, were stored at room temperature or 4°C when prepared in the experimental mixtures.

The VAMS-Mitra™ 10 µL samplers for capillary-blood collection and complementary 96-sample autorack for sampler drying were purchased from Neoteryx (Torrance, CA, USA). Vacutainer test tubes (1.6 mL) containing K3-EDTA (tripotassium salt of ethylenediamine tetraacetic acid) as an anticoagulant for whole-blood collection, and 4 mL test tubes with clot activator, as well as lancets, and blood collection sets, were obtained from Becton Dickinson (Warsaw, Poland) or Sarstedt (Nümbrecht, Germany). Simple laboratory materials such as tips, test tubes, and falcon tubes were purchased from Sarstedt (Nümbrecht, Germany) or GenoPlast Biotech (Rokocin, Poland). Chromatographic vials integrated with 300 µL inserts and complementary screw caps were obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) or Agilent (Santa Clara, CA, USA).

2. Calibrators

Primary stock solutions were prepared in glass ampules using solid standards for MPA (1 mg/mL), MPA- d₃ (0.1 mg/mL), and MPAG (0.1 mg/mL) via dissolving in methanol: water mixture (50:50, v/v). The above solutions were appropriately diluted to obtain the estimated concentration of working solutions and finally to generate the calibration curve. The SIL-IS working solution was prepared at a 25µL/mL concentration level and, in the next step, diluted during calibration curve preparation. The MPAG solution has diluted a hundredfold and was used only as a control for chromatographic separation of MPA and MPAG in patients' samples. Notable, the QC working solutions were prepared from other primary solutions of MPA than calibration curve points (but the same primary solution concentration-1 mg/mL). Working solutions were stored at -20°C in the freezer.

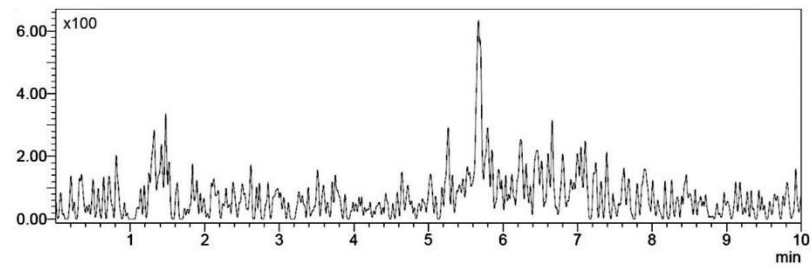
During the investigation, three types of matrices were used for calibration methods: plasma, whole blood, and capillary blood in VAMS samplers. The WB and PL samples were fortified abreast by spiking 50µL of each matrix with 10µL of calibration working solution or QC working solutions. The VAMS calibration sample was prepared by spiking the 50µL of WB with 10µL of the appropriate working solution after mixing by self-automated vortex (Chemland, Stargard, Poland) gently absorbing by VAMS tip. The calibration levels and quality controls (QC) for MPA were prepared at levels: 0.25, 0.35 (lower quality control, LQC), 0.5, 1.0, 2.5, 3.50 (medium quality control, MQC), 5.0, 10.0, 12.5 (higher quality control, HQC), and 15.0 µg/mL. The WB and PL without immunosuppressants were obtained from healthy volunteers.

3. Sample preparation protocol

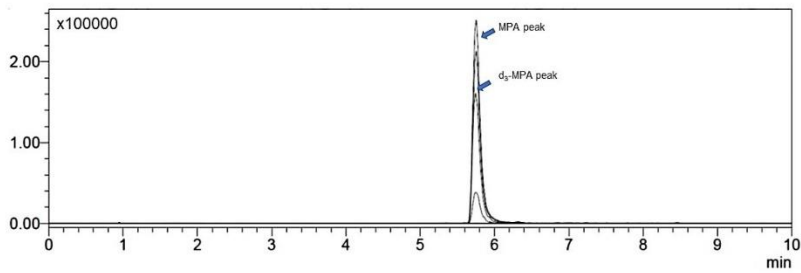
The 50µL of WB or PL was diluted with 90 µL pure water, and 10 µL of internal standard (d₃-MPA) was added. In the next step, 400 µL of the precipitation mixture (0.1M zinc sulfate aqueous solution and acetonitrile, 50:50 (v/v)) was added. After that, the sample was shaken for 10 min at RT using an automatic shaker (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and centrifuged for 10 min under 3500 rpm at 4°C in MPW-375 (MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland). 250 µL of obtained upper phase was transferred into insert integrated glass vials and analyzed with LC-MS/MS.

Loaded VAMS tips, after a minimum of 1h-drying, were removed and transferred into 150µL of pure deionized water. For analyte extraction, the samples were shaken at RT for 1 h at a frequency of 1000rpm using the above-mentioned shaker. After that, 10µL of IS solution and 150 µL above precipitation mixture were added. From this moment, the sample was treated under the same conditions as WB/PL sample.

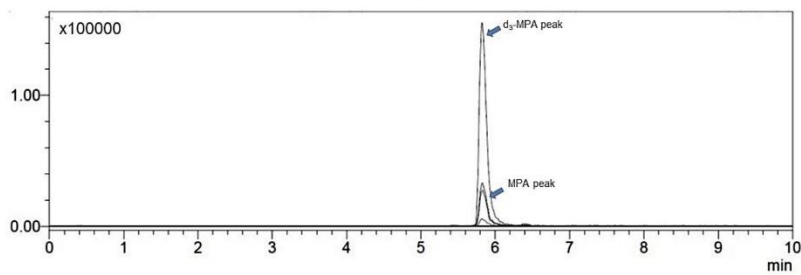
4. Representative chromatograms



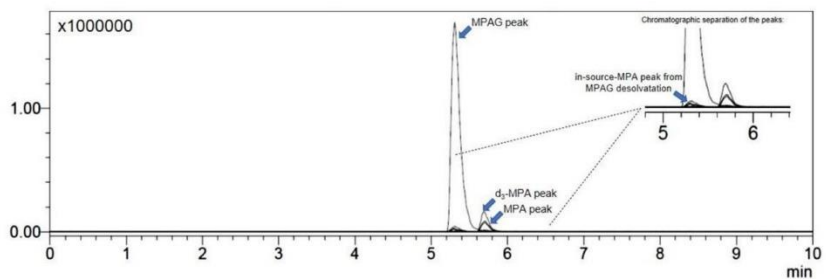
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure. Representative chromatograms for (a) blank VAMS sample, (b) HQC in the VAMS sample, (c) LQC in the VAMS sample, and (d) patient VAMS sample.

5. Summary of the analytical validation process

Table 1 Results of intra-run and between-run precision and accuracy evaluation [n=10]

Parameter	0.25 µg/mL			0.35 µg/mL			12.50 µg/mL			15.00 µg/mL		
	WB	PL	VAMS	WB	PL	VAMS	WB	PL	VAMS	WB	PL	VAMS
Intra-run accuracy and precision [n=10]												
C _{MPA} [µg/mL]	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.03	12.55 ± 0.32	12.12 ± 0.51	12.57 ± 0.23	15.16 ± 0.44	14.88 ± 0.61	14.37 ± 0.62
Accuracy [%]	102.72	98.25	109.45	97.71	96.38	102.14	100.36	96.85	100.57	101.05	99.22	98.21
Precision [%]	6.75	8.48	6.82	4.96	8.92	6.53	2.58	4.19	1.83	2.91	4.14	2.29
Between-run accuracy and precision [n=10]												
C _{MPA} [µg/mL]	0.25 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.01	12.55 ± 0.32	12.12 ± 0.51	12.59 ± 0.30	15.33 ± 0.45	14.88 ± 0.62	14.89 ± 0.62
Accuracy [%]	98.25	96.38	105.78	100.08	96.38	108.14	100.36	96.85	100.76	102.18	99.22	98.72
Precision [%]	8.48	8.92	5.85	5.43	8.48	3.75	2.58	4.19	2.39	2.96	4.14	1.54

Table 2 Results of stability in autosampler examination [n=6]

Parameter	0.35 µg/mL			12.50 µg/mL		
	WB	PL	VAMS	WB	PL	VAMS
Initial in autosampler						
C _{MPA} [µg/mL]	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.02	12.36 ± 0.42	12.28 ± 0.21	12.86 ± 0.17
Stability [%]	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
After 24h in autosampler						
C _{MPA} [µg/mL]	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.02	12.36 ± 0.58	12.15 ± 0.49	12.61 ± 0.45
Stability [%]	98.68	94.73	97.37	96.19	98.94	98.10
After 3 days in autosampler						
C _{MPA} [µg/mL]	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02	11.74 ± 0.29	11.93 ± 0.63	12.49 ± 0.32
Stability [%]	96.01	93.05	91.57	94.98	97.14	97.12
After 5 days in autosampler						
C _{MPA} [µg/mL]	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.02	10.76 ± 0.68	11.87 ± 0.46	12.19 ± 0.41
Stability [%]	91.66	86.11	86.84	87.05	90.39	92.34

Table 3 Results of short-term stability examination [n=6]

Parameter	0.35 µg/mL			12.50 µg/mL		
	0h	-2h	+2h	0h	-2h	+2h
WB						
C _{MPA} [µg/mL]	0.36 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.09	12.41 ± 0.33	12.22 ± 0.42	12.13 ± 0.51
Stability [%]	100.00	91.23	93.26	100.00	96.67	96.74
PL						
C _{MPA} [µg/mL]	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.06	0.35 ± 0.11	12.56 ± 0.37	12.23 ± 0.26	12.36 ± 0.63
Stability [%]	100.00	101.23	100.98	100.00	97.12	98.16
VAMS						
C _{MPA} [µg/mL]	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.10	12.62 ± 0.29	11.86 ± 0.31	12.09 ± 0.65
Stability [%]	100.00	96.69	91.26	100.00	96.97	95.89

Table 4 Results of matrix effect (ME), process efficiency (PE), and absolute recovery (AR) evaluation

Parameter	0.35 µg/mL			12.50 µg/mL		
	MPA	IS	F	MPA	IS	F
WB						
ME [%]	-25.83 ± 9.63	-35.52 ± 11.15	0.84 ± 0.13	-28.04 ± 8.34	-21.85 ± 7.02	0.79 ± 0.10
PE [%]	74.16 ± 3.26	64.47 ± 4.15	104.00 ± 2.45	71.96 ± 2.59	78.14 ± 3.01	97.28 ± 4.33
AR [%]	62.58 ± 4.86	62.19 ± 3.99	101.00 ± 4.12	67.71 ± 2.94	69.85 ± 2.88	99.79 ± 3.68
PL						
ME [%]	-24.96 ± 5.40	-22.11 ± 2.15	-8.73 ± 1.14	-24.93 ± 6.68	-16.63 ± 2.29	-1.12 ± 0.22
PE [%]	71.39 ± 3.57	77.88 ± 5.81	91.26 ± 2.88	75.77 ± 3.13	83.36 ± 3.84	98.87 ± 4.16
AR [%]	61.27 ± 5.36	69.87 ± 5.21	94.47 ± 3.01	65.31 ± 2.99	88.77 ± 3.80	98.96 ± 1.94
VAMS						
ME [%]	-25.58 ± 7.77	-24.16 ± 4.15	-1.18 ± 0.21	-37.34 ± 8.15	-29.43 ± 5.16	1.10 ± 0.19
PE [%]	64.26 ± 2.85	56.93 ± 2.02	98.81 ± 2.16	74.42 ± 3.14	75.84 ± 5.01	100.26 ± 4.44
AR [%]	63.52 ± 3.18	55.39 ± 4.12	93.77 ± 3.87	63.56 ± 4.22	61.95 ± 8.47	96.61 ± 6.21

6. Patients demographic data [n =50]

Variable	Patients' data*
number of patients	50
total number of samples	200
sex [male/female]	31/19
age [years]	11.26 ± 2.69 (4 – 17)
body weight [kg]	45.81 ± 15.41 (13.40 – 71.20)
height [m]	1.39 ± 0.16 (0.99 – 1.71)
MMF daily dose [mg]	678.95 ± 233.66 (250 – 1500)
MMF formulation [CellCept®]	50
hematocrit level [%]	36.29 ± 3.99 (29.00 – 46.20)
creatinine value [mg/dL]	0.88 ± 0.21 (0.56 – 1.49)
total protein concentration [g/L]	76.23 ± 4.28 (66 – 89)
albumin concentration [g/L]	45.38 ± 2.02 (42 – 51)
VAMS MPA concentration [µg/mL]	1.43 ± 0.77 (0.41 – 4.14)
VAMS MPA (corrected with Ht) concentration [µg/mL]	2.26 ± 1.23 (0.61 – 6.55)
VAMS MPA (corrected with formula) concentration [µg/mL]	2.37 ± 1.26 (0.74 – 6.72)
WB MPA concentration [µg/mL]	1.39 ± 0.84 (0.26 – 4.60)
PL MPA (LC-MS/MS) concentration [µg/mL]	2.47 ± 1.20 (0.86 – 6.92)
MPA (HPLC-DAD) concentration [µg/mL]	2.38 ± 1.16 (0.64 – 6.18)

*Data are expressed as mean ± SD (with min/max range)

7. Results of MPA determination in samples obtained from patients [n=50]

	MPA_DAD	MPA_WB	MPA_PL	MPA_VAMS	Hematocrit
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	
1	2,64	1,11	2,32	1,53	0,37
2	1,58	0,80	1,44	0,76	0,38
3	3,73	2,38	3,66	2,42	0,33
4	2,57	1,59	3,09	1,65	0,43
5	1,8	0,87	1,5	0,93	0,34
6	2,52	1,34	2,65	1,69	0,37
7	2,97	1,35	2,85	1,53	0,38
8	1,22	0,90	1,34	0,85	0,33
9	2,04	0,89	1,98	0,95	0,43
10	2,9	2,16	2,93	2,02	0,29
11	2,3	1,79	2,17	1,23	0,42
12	2,68	1,41	2,84	1,50	0,39
13	2,84	2,30	2,89	1,68	0,39
14	2,75	2,75	2,93	2,01	0,37
15	2,89	1,64	2,74	1,68	0,30
16	1,76	1,19	1,56	1,02	0,39
17	6,11	4,60	6,92	4,14	0,37
18	3,51	2,03	3,67	2,31	0,31
19	1,54	1,20	1,17	0,73	0,35
20	0,64	0,47	0,86	0,54	0,29
21	1,83	0,84	1,68	0,96	0,38
22	5,08	2,95	4,68	3,01	0,37
23	2,02	0,89	1,54	0,81	0,37
24	1,83	1,56	2,11	1,27	0,36
25	1,24	0,63	1,36	0,79	0,31
26	3,34	0,87	1,99	1,02	0,39
27	2,13	1,32	2,42	1,23	0,39
28	1,04	1,46	1,58	1,18	0,32

29	4,42	2,56	4,71	2,49	0,39
30	1,78	0,79	1,74	1,23	0,31
31	2,49	1,59	2,13	1,35	0,33
32	1,13	1,07	1,35	0,93	0,39
33	1,73	1,03	1,57	1,08	0,31
34	1,48	0,72	1,69	1,00	0,34
35	1,7	1,02	1,87	0,94	0,40
36	1,95	1,31	2,1	1,44	0,37
37	3,02	2,94	4,62	2,52	0,46
38	1,63	0,47	1,77	1,26	0,35
39	0,97	0,47	1,38	0,94	0,34
40	1	0,50	1,14	0,68	0,38
41	1,34	0,82	1,29	0,64	0,29
42	5,31	3,67	4,53	3,63	0,34
43	2,3	1,28	3,41	0,88	0,42
44	1,57	0,26	1,38	0,41	0,32
45	4,2	1,97	4,23	2,58	0,41
46	3,36	1,02	3,42	1,16	0,40
47	2,75	1,12	3,49	1,66	0,39
48	1,24	0,89	1,95	1,04	0,36
49	1,56	0,71	1,89	0,64	0,38
50	2,61	0,73	2,77	1,74	0,37

MPA_DAD – MPA concentration determined with the HPLC-DAD method
MPA_WB – MPA concentration in whole blood determined with UHPLC-MS/MS method
MPA_PL – MPA concentration in plasma determined with UHPLC-MS/MS method
MPA_VAMS – MPA concentration in VAMS capillary blood determined with UHPLC-MS/MS method

KOPIE ZGÓD KOMISJI BIOETYCZNEJ

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al: Dzieci Polskich 20
04-730 Warszawa-Międzylesie
T. (22) 815-16-03

UCHWAŁA nr 17/KBE/2022

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” na posiedzeniu w dniu 20.04.2022r. rozpatrzyła badanie pt: „Walidacja metody LC-MS/MS do oznaczania stężenia takrolimusu w próbkach krwi pacjentów po transplantacji nerki pobranych metodą objętościowo-absorpcyjną (VAMS)”.

Gł. Badacz: dr n med. Jacek Rubik

Do Komisji Bioetycznej Instytutu Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka wpłynął wniosek o wydanie opinii o projekcie eksperymentu medycznego „Walidacja metody LC-MS/MS do oznaczania stężenia takrolimusu w próbkach krwi pacjentów po transplantacji nerki pobranych metodą objętościowo-absorpcyjną (VAMS)”.

Zgłoszony projekt realizowany będzie jako badanie własne w ramach działalności klinicznej.

Badacz główny: dr n med. Jacek Rubik

Badaniem ankietowym zostanie objętych ok 60 dzieci po przeszczepieniu nerki. W wieku od 24 mcy do 18 lat. Projekt realizowany przez Poradnię Transplantacji Nerek, Pracownię Farmakokinetyki IPCZD oraz Zakład Chemii leków WUM.

Grupę badaną stanowią pacjenci po przeszczepieniu nerki, pozostający na leczeniu Takrolimusem pozostający pod opieką Poradni Transplantacji Nerek IPCZD.

Cel: sprawdzenie w warunkach klinicznych korelacji pomiędzy wynikami stężeń takrolimusu oznaczanych metodą CMIA (stosowaną w IPCZD), a nowa metodą VAMS i wynikami referencyjnej metody LC-MS/MS z krwi pełnej.

Badanie będzie przeprowadzone w czasie rutynowych wizyt ambulatoryjnych

Przetwarzanie danych odbywać się będzie zgodnie z przepisami ustawy RODO.

Do dokumentacji należy dołączyć list intencyjny z WUM.

Złożona dokumentacja zawarta we wniosku o wydanie opinii do Komisji Bioetycznej przy IPCZD, w sprawie przeprowadzenia eksperymentu medycznego „Walidacja metody LC-MS/MS do oznaczania stężenia takrolimusu w próbkach krwi pacjentów po transplantacji nerki pobranych metodą objętościowo-absorpcyjną (VAMS)” pozwala uznać badanie za zasadne oraz stwierdzić, że sposób jego przeprowadzenia odbędzie się według zasad GCP

Do zespołu badaczy należą:

Mgr Agnieszka Czajkowska
Dr hab. n farm Tomasz Pawiński
Mgr Arkadiusz Kocur

Przedłożone dokumenty:

1. Wniosek o wydanie opinii o projekcie
2. Streszczenie projektu
3. Informacja na temat badania oraz formularz zgody dla pacjenta w wieku <16 lat
4. Informacja na temat badania oraz formularz zgody dla rodzica

5. Informacja na temat badania oraz formularz zgody dla pacjenta w wieku 13-16 lat
6. Zgoda Kierownika Kliniki Nefrologii Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego
7. Opinia Eksperta

Na podstawie przedłożonej dokumentacji, dodatkowych wyjaśnień przedstawionych przez dr n. med. Jacka Rubika oraz dyskusji i wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna przy IPCZD wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania. Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Tekst uchwały został sporządzony w 2 jednobrzmiących egz. po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.

Dr Jacek Rubik wstrzymał się i nie brał udziału w głosowaniu

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ

przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
dr hab. n. med. prof. CMKP Sylwester Prokurat



KOMISJA BIOETYCZNA
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20
04-730 Warszawa-Międzylesie
T. (22) 815-16-03

UCHWAŁA nr 36/KBE/2022
OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” na posiedzeniu w dniu **19.10.2022r.** rozpatrzyła badanie pt: „**Optymalizacja leczenia immunosupresyjnego takrolimusem i kwasem mykofenolowym za pomocą mikropróbkowania wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) w celu poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych (adherence) w populacji pediatrycznej**”.

Gł. Badacz: dr n med. Jacek Rubik

Do Komisji Bioetycznej Instytutu Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka wpłynął wniosek z dnia 26.09.2022 r o wydanie opinii o projekcie eksperymentu medycznego „Optymalizacja leczenia immunosupresyjnego takrolimusem i kwasem mykofenolowym za pomocą mikropróbkowania wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) w celu poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych (adherence) w populacji pediatrycznej”

Do wniosku dołączono :

1. Streszczenie protokołu badania
2. Zgodę Kierownika Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IPCZD, Zakładu Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM, Pracowni Farmakokinetyki IPCZD
3. Formularz Świadomej Zgody Rodziców/opiekunów i Informacji o badaniu
4. Formularz Świadomej Zgody dla pacjenta poniżej 13 r. z, powyżej 13 .r.ż oraz powyżej 16 roku życia
5. Formularze ankiety satysfakcji pacjenta
6. Formularz ankiety przestrzegania zaleceń lekarskich przez pacjenta leczonego immunosupresyjnie

Zgłoszony projekt realizowany będzie w Poradni Transplantacji Nerek IPCZD, Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM, Pracowni Farmakokinetyki IPCZD w ramach badania własnego działalności klinicznej. Badaniem objętych będzie od 60 do 90 dzieci po przeszczepieniu nerki w wieku od 24 m-cy do 18 lat. Przewidywany termin zakończenia badania – wrzesień 2023r. Cel badania: opracowanie metody równoczesnego oznaczania stężenia C0 TAC i MPA we krwi włośniczkowej pobranej technologią VAMS w porównaniu ze standardowy pobraniem krwi żyłnej na stężenie leków metodą enzymatyczną.

W streszczeniu przedstawiono szczegółowy plan badania wraz ze sposobem randomizacji, ilości próbek pobranych w IPCZD i w domu pacjenta. Łączna objętość krwi nie przekroczy 0,5 ml na badanie. Jednocześnie zbierane będą ankiety satysfakcji pacjenta i przestrzegania zaleceń lekarskich.

Korzyść z badania to możliwość monitorowania leczenia immunosupresyjnego w domu pacjenta oraz poprawa stopnia przestrzegania zaleceń lekarskich.

Dane osobowe uczestników badania będą traktowane zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych.

Złożona dokumentacja zawarta we wniosku o wydanie opinii do Komisji Bioetycznej przy IPCZD, w sprawie przeprowadzenia eksperymentu medycznego „Optymalizacja leczenia

immunosupresyjnego takrolimusem i kwasem mykofenolowym za pomocą mikropróbki wolumetryczno-absorpcyjnego (VAMS) w celu poprawy przestrzegania zaleceń terapeutycznych (adherence) w populacji pediatrycznej" pozwala uznać badanie za zasadne oraz stwierdzić, że sposób jego przeprowadzenia odbędzie się według zasad GCP.

Do zespołu badaczy należą:

Mgr farm Arkadiusz Kocur
Agnieszka Czajkowska
Dr hab. n farm Tomasz Pawiński

Przedłożone dokumenty:

1. Wniosek o wydanie opinii o projekcie
2. Streszczenie projektu
3. Ankieta satysfakcji pacjenta
4. Ankieta dotycząca stopnia przestrzegania zaleceń lekarskich pacjenta
5. Informacja dla pacjenta powyżej 16 r ż
6. Informacja dla rodziców /przedstawicieli ustawowych
7. Informacja dla pacjenta powyżej 13 r ż
8. Informacja dla pacjenta poniżej 13 r ż
9. Zgoda Kierownika Zakładu Chemii leków WUM
10. Zgoda kierownika Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego
11. Opinia Eksperta

Na podstawie przedłożonej dokumentacji, dodatkowych wyjaśnień przedstawionych przez dr n med. Jacka Rubika dyskusji i wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna przy IPCZD wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania. Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Tekst uchwały został sporządzony w 2 jednobrzmiących egz. po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.

Dr n med. Jacek Rubik wstrzymał się i nie brał udziału w głosowaniu

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
dr hab. n. med. prof. CMKP Sylwester Prokurat



KOMISJA BIOETYCZNA
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20
04-730 Warszawa-Międzylesie
T. (22) 815-16-03

UCHWAŁA nr 15/KBE/2023

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” na posiedzeniu w dniu 15.03.2023 rozpatrzyła badanie pt: „Mikropróbki wolumetryczno-absorpcyjne (VAMS) jako nowe narzędzie służące do optymalizacji leczenia immunosupresyjnego i monitorowania czynności narządu u dzieci po przeszczepieniu nerki”

Gł. Badacz: dr n med. Jacek Rubik

Do Komisji Bioetycznej Instytutu Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka wpłynął wniosek z dnia 2.03.2023 r o wydanie opinii o projekcie eksperymentu medycznego

Do wniosku dołączono :

1. Streszczenie protokołu badania
2. Zgodę Kierownika Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IPCZD, Zakładu Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM, Pracowni Farmakokinetyki IPCZD
3. Formularz Świadomej Zgody Rodziców/opiekunów i Informacji o badaniu
4. Formularz Świadomej Zgody dla pacjenta powyżej 13 .r.ż

Badanie przeprowadzone będzie jako grant statutowy w Klinice Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego, Pracowni Farmakokinetyki IPCZD oraz Zakładu leków Wydziału Farmaceutycznego WUM. Badaniem objętych będzie 45 pacjentów po przeszczepieniu nerki w wieku od 8 do 18 lat.

Cel: Optymalizacja monitorowania leczenia immunosupresyjnego poprzez umożliwienie częstych pobrań krwi za pomocą techniki VAMS oraz oznaczenia profilu farmakokinetycznego leków (takrolimus i MMF) i stężenia kreatyniny w warunkach domowych.

Oczekuje się znaczącej poprawy stopnia przestrzegania zaleceń lekarskich u dzieci po przeszczepieniu nerki.

Złożona dokumentacja zawarta we wniosku o wydanie opinii do Komisji Bioetycznej przy IPCZD, w sprawie przeprowadzenia eksperymentu medycznego „Mikropróbki wolumetryczno-absorpcyjne (VAMS) jako nowe narzędzie służące do optymalizacji leczenia immunosupresyjnego i monitorowania czynności przeszczepu dzieci po przeszczepieniu nerki” pozwala uznać badanie za zasadne oraz stwierdzić, że sposób jego przeprowadzenia odbędzie się według zasad GCP.

Do zespołu badaczy należą:

Mgr farm Arkadiusz Kocur
Mgr Agnieszka Czajkowska
Dr hab. Tomasz Pawiński
Lek med. Justyna Lesiak

15.03.2023
15.03.2023
15.03.2023

Przedłożone dokumenty:

1. Wniosek o wydanie opinii o projekcie
2. Streszczenie protokołu badania
3. Zgodę Kierownika Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IPCZD, Zakładu Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM, Pracowni Farmakokinetyki IPCZD
4. Formularz Świadomej Zgody Rodziców/opiekunów i Informacji o badaniu
5. Formularz Świadomej Zgody dla pacjenta powyżej 13 r.ż
6. Opinia Eksperta

Na podstawie przedłożonej dokumentacji, dodatkowych wyjaśnień przedstawionych przez dr n med. Jacka Rubika oraz dyskusji i wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna przy IPCZD wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania. Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Tekst uchwały został sporządzony w 2 jednobrzmiących egz. po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.

Dr Jacek Rubik wstrzymał się i nie brał udziału w głosowaniu

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ

przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
dr hab. n. med. prof. CMKP Sylwester Prokurat

OŚWIADCZENIA AUTORA CYKLU DOKTORSKIEGO

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr farm. Arkadiusz Kocur
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

obejmował on opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, napisanie manuskryptu, współudział w pisaniu odpowiedzi do recenzentów

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **80%**.

Arkadiusz Kocur
magister farmacji
19071503

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr farm. Arkadiusz Kocur
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

*Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive
Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS
Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application*

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie
i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

**obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne
wykonanie walidacji metod analitycznych, przeprowadzenie analiz statystycznych,
praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie
manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma**

(autor korespondujący)

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 70%.

Arkadiusz Kocur

magister farmacji

19071503

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr farm. Arkadiusz Kocur
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 70%

Arkadiusz Kocur
magister farmacji
19071503

Arkadiusz Kocur
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

**OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PRAC WCHODZĄCYCH
W SKŁAD CYKLU DOKTORSKIEGO**

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

dr hab. Tomasz Pawiński
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Volumetric Absorptive Microsampling in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs—From Sampling and Analytical Issues to Clinical Application
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

**opracowanie koncepcji pracy, korekta manuskryptu, kontakt z redakcją czasopisma
(autor korespondujący)**

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **20%**.

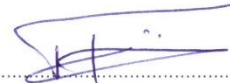
Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **80%**,
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

**obejmował on opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, napisanie manuskryptu,
współudział w pisaniu odpowiedzi do recenzentów**

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

Dr Dorota Marszałek
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

zaplanowanie eksperymentów, walidacja metody oznaczania takrolimusa we krwi metodą LC-MS/MS, edycja manuskryptu, bezpośredni nadzór nad pracami eksperymentalnymi

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **10%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, przeprowadzenie analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

Dr Jacek Rubik
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

rekrutacja pacjentów do badania, pobieranie i zabezpieczenie materiału biologicznego, uzyskanie zgody Komisji Bioetycznej, opracowanie klinicznej bazy danych pacjentów

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, przeprowadzenie analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

dr n. med. Jacek Rubik
Specjalista pediatrii,
neurologii, nefrologii dziecięcej
i nefrologii klinicznej
3198

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr Agnieszka Czajkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

zabezpieczenie materiału biologicznego do badań, pomoc w opracowaniu bazy danych pacjentów, wykonaniu analiz i walidacji metod analitycznych, pisaniu manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, przeprowadzenie analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Agnieszka Czajkowska.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

Dr hab. Tomasz Pawiński
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus Based on Volumetric Absorptive Microsampling Technique (VAMS) in Renal Transplant Pediatric Recipients—LC-MS/MS Method Development, Hematocrit Effect Evaluation, and Clinical Application

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

obejmował on opracowanie koncepcji pracy oraz bezpośredni nadzór nad jej przeprowadzeniem, pisanie i edycja manuskryptu, zapewnienie finansowania i aparatury niezbędnych do wykonania eksperymentów

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **10%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

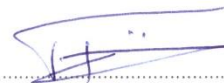
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, przeprowadzenie analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej **mgr farm. Arkadiusza Kocura**

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

dr Jacek Rubik
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

rekrutacja pacjentów do badania, pobieranie i zabezpieczenie materiału biologicznego, uzyskanie zgody Komisji Bioetycznej, opracowanie klinicznej bazy danych pacjentów

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on **opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)**

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

dr n. med. Jacek Rubik
specjalista pediatrii,
nefrologi, nefrologii dziecięcej
i transplantologii klinicznej
..... 31.09.2023

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr Paweł Czarnowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w statystycznym opracowaniu procesu walidacji analitycznej, krzyżowej i klinicznej opisanych metod LC-MS/MS

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **5%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejscowość, data)

mgr Agnieszka Czajkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

zabezpieczenie materiału biologicznego do badań, pomoc w opracowaniu bazy danych pacjentów, wykonaniu analiz i walidacji metod analitycznych, pisaniu manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **5%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Agnieszka Czajkowska
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

dr Dorota Marszałek
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

obejmował on opracowanie koncepcji pracy oraz bezpośredni nadzór nad jej przeprowadzeniem

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3%.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejscowość, data)

mgr Maciej Sierakowski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w przeprowadzeniu analiz metodą LC-MS/MS (optymalizacja warunków pracy detektora, zapewnienie dostępu do aparatury analitycznej)

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **1%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

mgr Marta Górska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

praktyczne wykonanie i opisanie metody HPLC-DAD oznaczania kwasu mykofenolowego
Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako 70%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

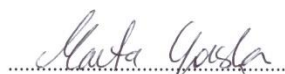
obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współudział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr farm. Arkadiusza Kocura

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 03.07.2023
(miejsowość, data)

Dr hab. Tomasz Pawiński
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt.

Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA) using Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) in Pediatric Renal Transplant Recipients Treated Concomitantly with Tacrolimus – LC-MS/MS Method Development, Cross-Validation, and Clinical Application.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

obejmował on opracowanie koncepcji pracy oraz bezpośredni nadzór nad jej przeprowadzeniem, pisanie i edycja manuskryptu, zapewnienie finansowania i aparatury niezbędnych do wykonania eksperymentów

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **10%**.

Wkład **mgr farm. Arkadiusza Kocura** w powstawanie publikacji określam jako **70%**,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie eksperymentów, praktyczne wykonanie walidacji metod analitycznych, współludział w przeprowadzeniu analiz statystycznych, praktyczne wykonania wszystkich eksperymentów i ich opisanie, napisanie manuskryptu, edycja manuskryptu, kontakt z edytorem czasopisma (autor korespondujący)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej **mgr farm. Arkadiusza Kocura**

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

