

Dried blood spots voor het bepalen van de serumconcentratie van tamoxifen en zijn actieve metaboliet endoxifen

Nynke G.L. Jager ^{a*}, Hilde Rosing ^a, Jan H.M. Schellens ^{bc},
Jos H. Beijnen ^{abc} en Sabine C. Linn ^{de}

^a Ziekenhuisapotheek, Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis, Amsterdam.

^b Klinische Farmacologie, Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^c Departement Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht.

^d Moleculaire Pathologie, Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam.

^e Pathologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

* Thans: Ziekenhuisapotheek Academisch Medisch Centrum, Amsterdam. Correspondentie: NGLJager@gmail.com.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Dit artikel is een verkorte vertaling van: Jager NGL, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH, Linn SC. Use of dried blood spots for the determination of serum concentrations of tamoxifen and endoxifen. Breast Cancer Res Treat. 2014 jul;146(1):137-44.

Citeer als: Jager NGL, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH, Linn SC. Dried blood spots voor het bepalen van de serumconcentratie van tamoxifen en zijn actieve metaboliet endoxifen. Nederlands Platform voor Farmaceutisch Onderzoek. 2016;1:A1605.

Kernpunten

- De correlatie tussen tamoxifen en endoxifen in serum en in een *dried blood spot* (DBS) kan worden beschreven door te corrigeren voor hematocriet en de verdelingscoëfficiënt bloedcel/serum.
- Serumconcentraties van tamoxifen kunnen uit DBS-concentraties berekend worden met de vergelijking: $[Tam]_{s,calc} = [Tam]_{DBS}/0,779$.
- Serumconcentraties van de actieve metaboliet endoxifen kunnen uit DBS-concentraties berekend worden met de vergelijking: $[End]_{s,calc} = [End]_{DBS}/0,663$.

Inleiding

Tamoxifen wordt veelvuldig gebruikt bij de behandeling van oestrogenreceptorpositieve borstkanker. Verschillende studies hebben aangetoond dat tamoxifen uitgebreid gemetaboliseerd wordt [1, 2], waarbij *N*-desmethyl-4-hydroxytamoxifen (endoxifen) en 4-hydroxytamoxifen worden gezien als de actiefste metabolieten, 30-100 keer potenter dan tamoxifen zelf [3, 4]. Mede omdat de *steady state*-serumconcentratie van endoxifen ongeveer een factor 5 hoger is dan die

ABSTRACT

Use of dried blood spots for the determination of serum concentrations of tamoxifen and endoxifen

OBJECTIVE

To establish the relationship between dried blood spot (DBS) and serum concentrations of tamoxifen and endoxifen in order to allow the use of DBS sampling, a simple and patient-friendly alternative to venous sampling, in clinical practice. The anti-estrogenic effect of tamoxifen is suggested to be mainly attributable to its metabolite endoxifen, and a minimum therapeutic threshold for endoxifen in serum has been proposed.

DESIGN AND METHODS

Paired DBS and serum samples were obtained from 50 patients using tamoxifen and analysed using HPLC-MS/MS. Serum concentrations were calculated from DBS concentrations using the formula: calculated serum concentration = DBS concentration/[(1 – haematocrit) + (blood cell/serum ratio) × haematocrit]. The blood cell/serum ratio was determined *ex vivo* by incubating a batch of whole blood spiked with both analytes and imputed as a fixed value. The average haematocrit for female adults was imputed as a fixed value. Calculated and analysed serum concentrations were compared using weighted Deming regression.

RESULTS

Weighted Deming regression analysis comparing 44 matching pairs of DBS and serum samples showed a proportional bias for both analytes. Serum concentrations were calculated using $[Tam]_{s,calc} = [Tam]_{DBS}/0.779$ and $[End]_{s,calc} = [End]_{DBS}/0.663$. Calculated serum concentrations were within 20% of analysed serum concentrations in 84 and 100% of patient samples for tamoxifen and endoxifen, respectively.

CONCLUSION

DBS concentrations of tamoxifen and endoxifen were equal to serum concentrations after correction for haematocrit and blood cell/serum ratio. DBS sampling can be used in clinical practice.

van 4-hydroxytamoxifen, wordt endoxifen gezien als de belangrijkste metaboliet. Metabolieten worden voor-

namelijk gevormd in de Z-vorm ($Z = \text{zusammen}$) omdat tamoxifen als pure Z-isomeer wordt geproduceerd [5].

In de huidige situatie krijgt iedere patiënt een standaarddosering van 20 mg tamoxifen per dag. Er blijkt echter een grote interindividuele variatie te zijn in spiegels van tamoxifen en zijn metabolieten [6] en verschillende in-vitro-studies hebben aangetoond dat het farmacologische effect van de actieve metabolieten concentratieafhankelijk is [7-9]. Deze bevindingen hebben aanleiding gegeven tot de theorie dat individueel doseren op basis van actieve metabolietconcentraties kan bijdragen aan het therapeutische effect. Deze benadering wordt ondersteund door de resultaten van een grote retrospectieve studie, waarin een significante associatie werd gevonden tussen serumconcentraties endoxifen en het terugkeren van borstkanker. Tevens werd een therapeutische ondergrens voor endoxifen gesuggereerd; patiënten met een serumconcentratie endoxifen boven 5,9 ng/mL hadden een 26% lagere kans dat de borstkanker terugkwam [10].

De huidige praktijk voor kwantificering van endoxifen is analyse van serummonsters van patiënten die zijn verkregen door een venapunctie in de kliniek. Een patiëntvriendelijker methode is het gebruik van *dried blood spots* (DBS'en). Bij DBS-bemonstering wordt een druppel bloed, afgenomen via een vingerprik, gedroogd op een speciale DBS-kaart en in het laboratorium geëxtraheerd en geanalyseerd. Patiënten kunnen deze monsters zelf thuis afnemen en naar het laboratorium versturen via de reguliere post [11, 12]. Voordat DBS'en kunnen worden toegepast in de dagelijkse praktijk, is het van belang dat de verhouding tussen serumconcentraties en DBS-concentraties onderzocht is, aangezien deze in principe niet gelijk zijn en de gesuggereerde grenswaarde voor endoxifen is bepaald in serum [10]. Het doel van dit onderzoek is het vaststellen van de ratio tussen serum- en DBS-concentraties van tamoxifen en endoxifen, zodat DBS-bemonstering voor patiënten die tamoxifen gebruiken, in de praktijk kan worden toegepast.

Methoden

Patiënten

Vijftig vrouwelijke patiënten die een chirurgische behandeling voor oestrogenreceptorpositieve borstkanker hebben ondergaan en aansluitend minimaal twee maanden zijn behandeld met tamoxifen, werden gerekruteerd in de polikliniek van het Antoni van Leeuwenhoekziekenhuis. Dit aantal patiënten is gebaseerd op de *Guidelines for method comparison* van het Clinical and Laboratory Standards Institute [13]. In deze polikliniek wordt aan patiënten die tamoxifen gebruiken aangeboden dat de *steady state*-concentraties van tamoxifen en endoxifen bepaald kunnen worden in het kader van individualisatie van de dosis [14]. Patiënten die gebruikmaken van deze service werd gevraagd of ze wilden participeren in deze studie, waarbij ze,

naast een venapunctie om een serummonster te verkrijgen, ook een vingerprik wilden ondergaan ter verkrijging van een DBS-monster.

Het studieprotocol (NTR4042) was goedgekeurd door de Medisch Ethische Commissie van het Nederlands Kanker Instituut (NKI) en iedere patiënt heeft na uitleg over het doel van de studie en voorafgaand aan de bloedafname getekend voor *informed consent*.

Bloedafname en analyse

De DBS'en, minimaal twee per patiënt, werden binnen vijf minuten na de venapunctie verkregen met behulp van een *contact-activating* lancet van 1,8 mm (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Verenigde Staten). De druppel bloed werd opgevangen op een Whatman FTA DMPK-A DBS card (Whatman, GE Healthcare, Buckinghamshire, Verenigd Koninkrijk) en minimaal drie uur aan de lucht gedroogd. De DBS'en werden bij kamertemperatuur opgeslagen in een aluminium zakje met een droogzakje tot het moment van analyse, maximaal zes weken later.

Voorafgaand aan de analyse werden de DBS'en visueel gecontroleerd: de spots moesten minimaal een doorsnede hebben van 6 mm en er moest een donkerrode verkleuring zichtbaar zijn aan beide zijden van het papier. De goedgekeurde DBS'en werden tegelijk met de DBS-kalibratiestandaarden en controlemonsters geëxtraheerd en geanalyseerd volgens een gevalideerde hogedrukvlloeistofchromatografische methode met tweevoudige massaspectrometrie (HPLC-MS/MS) [15].

Bloedmonsters die waren verkregen via een venapunctie werden binnen een uur na afname gecentrifugeerd, waarna het serum werd bewaard bij -70°C tot het moment van analyse. Serumconcentraties van tamoxifen en endoxifen werden gemeten met een gevalideerde HPLC-MS/MS-methode [14, 16, 17]. DBS- en serummonsters werden in duplo opgewerkt, zoals beschreven in de *Guidelines for method comparison* [13].

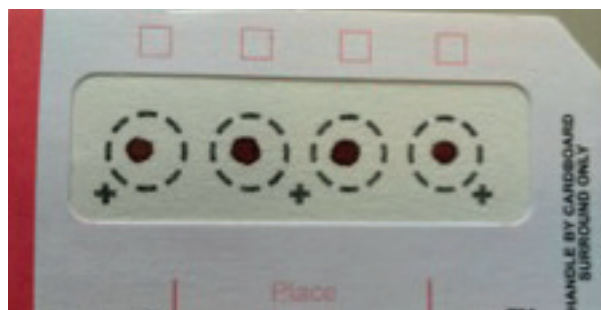
Dried blood spot- versus serumconcentraties

Bloed bestaat uit serum, rode en witte bloedcellen en bloedplaatjes. Het volume van witte bloedcellen en bloedplaatjes is zeer klein. De concentratie van een analiet in bloed kan worden berekend met vergelijking 1 [18], waarbij $[\text{Ana}]_b$ de analietconcentratie in het bloed is, $[\text{Ana}]_s$ de analietconcentratie in serum, V_s het serumvolume, $[\text{Ana}]_c$ de concentratie in bloedcellen, V_c het volume van de bloedcellen en V_b het bloedvolume.

$$[\text{Ana}]_b = ([\text{Ana}]_s \times V_s + [\text{Ana}]_c \times V_c) / V_b \quad (\text{vgl. 1})$$

Uit deze vergelijking blijkt dat het verschil tussen DBS- en serumconcentraties afhangt van de concentratie van een analiet in bloedcellen en het volume van serum en bloedcellen in volbloed.

De concentratie van een analiet in bloedcellen hangt af van de verdelingscoëfficiënt bloedcel/serum ($K_{c/s}$), die

Figuur 1 Voorbeelden van bruikbare en onbruikbare *dried blood spots*

Links: *dried blood spot* (DBS) die voldoet aan de criteria: het geheel vullen van een cirkel van minimaal 6 mm en donkerrode verkleuring aan beide zijden van het papier. **Rechts:** DBS die niet voldoet: er is geen cirkel van minimaal 6 mm gevuld met bloed. 6 mm is de maat van de pons die gebruikt is om de DBS uit het kaartje te ponsen en te extraheren.

weer afhangt van de doorlatendheid van het celmembraan voor de betreffende stof en de affiniteit van de analiet voor bestanddelen in het serum of de bloedcellen [18-21]. De concentratie van een analiet in bloedcellen kan bepaald worden met behulp van vergelijking 2 [18].

$$[\text{Ana}]_c = K_{c/s} \times [\text{Ana}]_s \quad (\text{vgl. 2})$$

Er is een substantiële interindividuele variatie in het volume van het bloed dat wordt ingenomen door rode bloedcellen, de hematocriet. Als de hematocriet (Hct) bekend is, kan met behulp van de vergelijkingen 3 en 4 het volume van zowel het serum als de bloedcellen in een volbloedmonster worden berekend.

$$V_c = \text{Hct} \times V_b \quad (\text{vgl. 3})$$

$$V_s = (1 - \text{Hct}) \times V_b \quad (\text{vgl. 4})$$

Samenvoeging van vergelijking 1 met vergelijkingen 2-4 levert vergelijking 5 [18].

$$[\text{Ana}]_b \times V_b = [\text{Ana}]_s \times (1 - \text{Hct}) \times V_b + K_{c/s} \times [\text{Ana}]_s \times \text{Hct} \times V_b \quad (\text{vgl. 5})$$

Herschrijven van vergelijking 5 geeft vergelijking 6 [18], welke gebruikt kan worden om analietconcentraties in volbloed (DBS) om te rekenen naar concentraties in serum.

$$[\text{Ana}]_s = [\text{Ana}]_b / \{(1 - \text{Hct}) + K_{c/s} \times \text{Hct}\} \quad (\text{vgl. 6})$$

Verdeling bloedcel/serum

Omdat bloed zonder anticoagulans zou stollen tijdens het experiment, is niet de $K_{c/s}$ bepaald, maar de verdeelingscoëfficiënt bloedcel/plasma ($K_{c/p}$). Hierbij is aangenomen dat de $K_{c/p}$ en de $K_{c/s}$ gelijk zijn.

$K_{c/p}$ is ex vivo bepaald in vers afgenomen humaan volbloed van een gezonde vrijwilliger (die geen tamoxifen gebruikt), met een hematocriet van 0,41 L/L. Aan 6 mL van dit monster is tamoxifen en endoxifen toegevoegd in drie verschillende hoeveelheden. De monsters werden

gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werden de monsters 10 minuten gecentrifugeerd en werd het plasma gescheiden van de bloedcellen. Per concentratie werden drie plasmamonsters opgewerkt en geanalyseerd met de eerdergenoemde HPLC-MS/MS-methode. De concentratie van de analieten in bloedcellen werd berekend met behulp van de vergelijkingen 1-3. $K_{c/p}$ werd berekend door de berekende analietconcentratie in bloedcellen te delen door de gemeten analietconcentratie in plasma (zie vergelijking 2).

Statistiek

Geanalyseerde DBS- en serumconcentraties zijn vergeleken met een gewogen Deming-regressie.

Uit DBS-concentraties zijn serumconcentraties berekend met behulp van vergelijking 6, waar $[\text{Ana}]_b$ staat voor de analietconcentratie in DBS'en. De serumconcentraties die zijn berekend uit DBS-concentraties en de geanalyseerde serumconcentraties, zijn eveneens vergeleken met gebruik van een gewogen Deming-regressie.

Alle statistische analyses zijn uitgevoerd met Analyse-it (Method evaluation edition, version 2.30; Analyse-it Software, Leeds, Verenigd Koninkrijk). Acceptatiecriteria voor overeenstemming tussen berekende en geanalyseerde serumconcentraties waren gebaseerd op de richtlijn *Bio-analytical method validation* van het European Medicines Agency (EMA); het verschil in concentratie dient binnen $\pm 20\%$ van het gemiddelde te zijn voor minimaal 67% van de monsters [22].

Resultaten

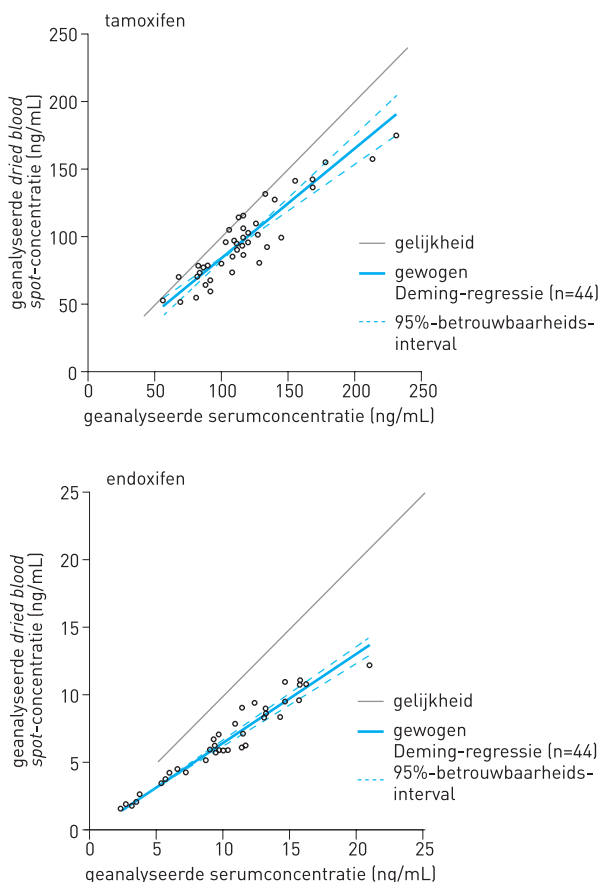
Patiënten

Van de 50 gerekruteerde patiënten hebben 44 (median leeftijd 53 jaar, spreiding 25-76 jaar) minimaal 1 bruikbare DBS geleverd en zij werden geïncubeerd in de studie. 6 patiënten hebben geen enkele bruikbare DBS geleverd. Hun DBS'en waren allemaal te klein; het minimaal beno-

Tabel 1 Resultaten van het bloed/plasma-verdelingsexperiment (n = 3)

Analiet	Concentratie volbloed (ng/mL)	Geanalyseerde concentratie plasma (ng/mL)	Verhouding bloed/plasma	Berekende concentratie bloedcellen (ng/mL)	Verdeling bloedcel/plasma
Tamoxifen	12,4	16,3	0,763	6,86	0,422
	49,8	64,3	0,774	28,9	0,450
	398	498	0,800	255	0,512
Gemiddelde			0,779		0,461
Endoxifen	2,49	3,78	0,660	0,641	0,170
	9,95	15,2	0,656	2,44	0,161
	79,6	118	0,675	24,3	0,206
Gemiddelde			0,663		0,179

De concentratie volbloed is de theoretische concentratie van analiet in het monster volbloed bij de start van het experiment, waarbij drie verschillende hoeveelheden tamoxifen en endoxifen zijn toegevoegd aan een buis met vers afgenomen volbloed van een gezonde vrijwilliger.

Figuur 2 Geanalyseerde dried blood spot-concentraties uitgezet tegen geanalyseerde serumconcentraties

digde gebied van 6 mm voor het ponsen was niet volledig gevuld met bloed aan beide kanten van de DBS-kaart (figuur 1 toont bruikbare en niet bruikbare DBS'en). Voor 40 patiënten resulteerde de vingerprik in minimaal twee bruikbare DBS'en; voor deze patiënten zijn twee DBS'en geëxtraheerd en geanalyseerd.

Van de geïncludeerde patiënten gebruikten 39 (89%) de standaarddosis van 20 mg tamoxifen per dag. 1 patiënt gebruikte 10 mg tamoxifen per dag, 2 patiënten gebruikten 30 mg per dag en 2 patiënten gebruikten 40 mg per dag.

Verdeling bloedcel/plasma

De verdelingscoëfficiënt bloedcel/plasma was 0,461 voor tamoxifen en 0,179 voor endoxifen (tabel 1).

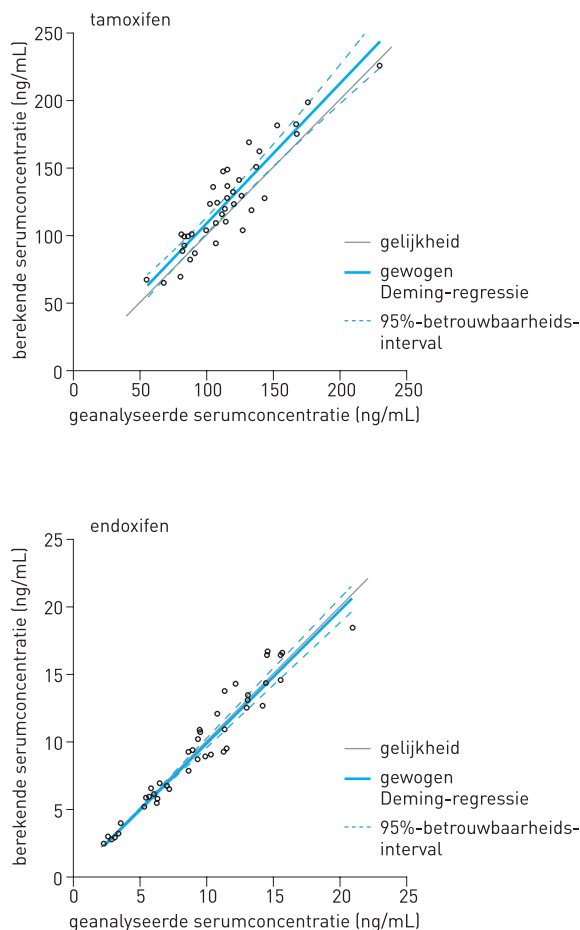
Dried blood spot- versus serumconcentraties

De gemeten concentraties in serummonsters varieerden tussen 54,7 en 231 ng/mL (herhaalbaarheid: *coefficient of variation* [CV] 2,7%) voor tamoxifen, en tussen 2,12 en 21,6 ng/mL (herhaalbaarheid: CV 4,7%) voor endoxifen. De gemeten concentraties in de DBS-monsters lagen voor tamoxifen tussen 51,0 en 176 ng/mL (herhaalbaarheid: CV 5,2%) en voor endoxifen tussen 1,61 en 12,2 ng/mL (herhaalbaarheid: CV 4,7%).

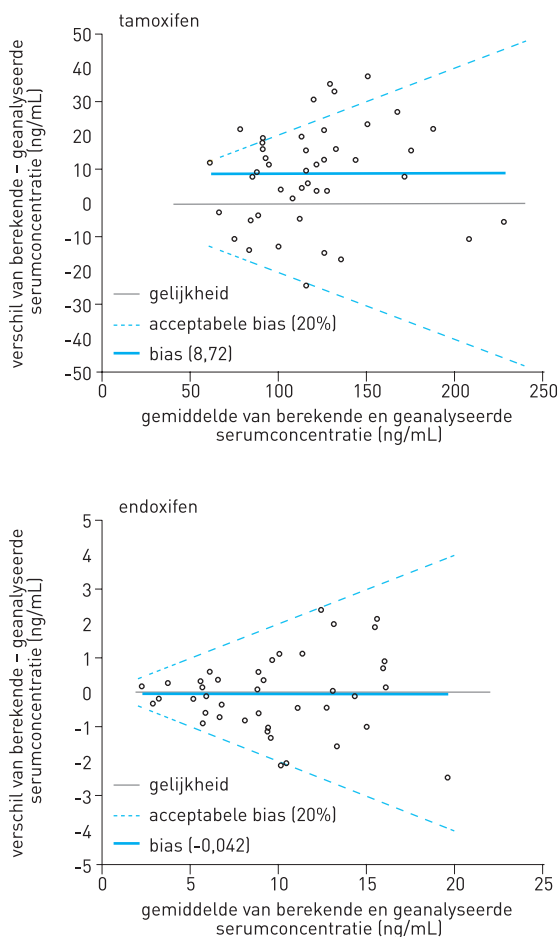
De relatie tussen concentraties tamoxifen en endoxifen gemeten in DBS'en en serummonsters is weergegeven in figuur 2. De helling van de tamoxifencurve was 0,81 (95%-betrouwbaarheidsinterval [BI95] 0,69-0,92), het snijpunt met de y-as is 3,42 (BI95 -9,10-15,9). Voor endoxifen is de helling van de curve 0,65 (BI95 0,61-0,99) en het snijpunt met de y-as 0,03 (BI95 -0,21-0,27).

Serumconcentraties zijn berekend uit gemeten DBS-concentraties met behulp van vergelijking 6, waar de gemiddelde hematocriet van de doelgroep – volwassen

Figuur 3 Berekende serumconcentraties, gebaseerd op gemeten *dried blood spot*-concentraties, uitgezet tegen geanalyseerde serumconcentraties



Figuur 4 Bland-Altman-plots



De berekende serumconcentratie zijn gebaseerd op *dried blood spot*-concentraties.

De grijze lijn, waarbij het verschil 0 is, is de lijn van volledige gelijkheid. De blauwe lijn is het gemiddelde verschil en de stippellijnen geven een bias van 20% aan.

vrouwen – (0,41 L/L [23]) en de in vitro verkregen $K_{c/s}$ (0,461 voor tamoxifen en 0,179 voor endoxifen) zijn ingevuld als vaste waarden. Dit resulteert in de vergelijkingen 7 en 8, die gebruikt kunnen worden voor het berekenen van serumconcentraties uit gemeten DBS-concentraties.

$$[\text{Tam}]_{s,\text{calc}} = [\text{Tam}]_{\text{DBS}} / 0,779 \quad (\text{vgl. 7})$$

$$[\text{End}]_{s,\text{calc}} = [\text{End}]_{\text{DBS}} / 0,663 \quad (\text{vgl. 8})$$

De relatie tussen de berekende en geanalyseerde serumconcentraties is weergegeven in figuur 3. De helling en het snijpunt weken voor beide analieten niet significant af van respectievelijk 1 en 0. De helling van de tamoxifen-curve is 1,04 (BI95 0,89-1,19), het snijpunt met de y-as is 4,39 (BI95 –11,7-20,5). De helling van de endoxifencurve

is 0,99 (BI95 0,93-1,05), het snijpunt met de y-as is 0,05 (BI95 –0,31-0,41).

De Bland-Altman-plot (figuur 4) laat een minimale bias zien voor de berekende serumconcentraties ten opzichte van de gemeten serumconcentraties: 8,72 ng/mL voor tamoxifen en 0,042 ng/mL voor endoxifen.

De gemiddelde berekende serumconcentratie tamoxifen was binnen $\pm 20\%$ van het gemiddelde van de geanalyseerde serumconcentraties in 84,1% van de patiëntenmonsters en voor endoxifen in 100% van de patiëntenmonsters.

Beschouwing

Met deze studie hebben we laten zien dat serumconcentraties berekend uit DBS-concentraties voor tamoxifen en endoxifen vergelijkbaar zijn met geanalyseerde serum-

concentraties. Dit is de eerste studie waarbij de correlatie van tamoxifen en actieve metaboolconcentraties in serum- en DBS-monsters geëvalueerd is. We hebben laten zien dat het verschil tussen concentraties in DBS- en serummonsters verklaard kan worden door de analietspecifieke bloedcel/serum-verdelingscoëfficiënt en de hematocriet, waarbij een vergelijking uit de literatuur gebruikt is [18, 19].

Voor endoxifen resulteerde het gebruik van deze formule in een zeer kleine bias tussen de berekende en geanalyseerde serumconcentraties: slechts $-0,042$ ng/mL. Voor tamoxifen was deze bias wat groter: $-8,72$ ng/mL. Tamoxifenconcentraties in patiënten zijn echter een stuk hoger dan endoxifenconcentraties, waardoor de bias van $-8,72$ niet als klinisch relevant ervaren wordt. Tevens ligt voor 84% van de monsters de berekende serumconcentratie binnen 20% van de geanalyseerde serumconcentratie, wat ruim binnen de door het EMA gestelde norm van minimaal 67% van de monsters valt [15].

We hebben laten zien dat de bloedcel/serum-verdelingscoëfficiënt voor beide analieten onafhankelijk is van de concentratie, zodat deze als vaste waarde gebruikt kon worden in de vergelijking. De beoogde populatie voor de toepassing van de DBS-methode bestaat uit volwassen vrouwen die zijn behandeld voor vroege borstkanker en die adjuvante behandeling met tamoxifen ondergaan. Dit resulteert in een relatief homogene groep patiënten waarbij fysiologische condities met een groot effect op de hematocriet niet verwacht worden. Kortom, de hematocriet van de beoogde populatie ligt naar verwachting binnen de referentiewaarden voor volwassen vrouwen: tussen 0,36 en 0,46 L/L [23]. Voor acht van de geïncludeerde patiënten was de hematocriet gemeten voor een ander doel dan deze studie; deze waarden lagen tussen 0,34 en 0,42 L/L. De validatie van de bioanalytische methode heeft aangetoond dat de resultaten van DBS-monsters met een hematocriet tussen 0,29 en 0,48 L/L binnen bioanalytische grenzen valt [15]. Deze bevindingen geven aan dat voor de beoogde toepassing van deze methode de gemiddelde hematocriet voor volwassen vrouwen, 0,41 L/L [23], als vaste waarde gebruikt kan worden. Dit is van belang aangezien een venapunctie nodig is voor het bepalen van de hematocriet, waardoor een groot voordeel van de DBS-methode – de mogelijkheid voor patiënten om thuis zelf een monster af te nemen – teniet zou worden gedaan.

Het invullen van een vaste waarde voor zowel de bloedcel/serum-verdelingscoëfficiënt als de hematocriet resulteert in twee simpele conversieformules: $[\text{Tam}]_{\text{s,calc}} = [\text{Tam}]_{\text{DBS}}/0,779$ en $[\text{End}]_{\text{s,calc}} = [\text{End}]_{\text{DBS}}/0,663$. Als deze methode zou worden toegepast voor patiënten bij wie verwacht wordt dat de hematocriet afwijkt van gevalideerde waarden (0,29 tot 0,48 L/L), kan worden gecorrigeerd door vergelijking 6 te gebruiken en de gemeten hematocriet in te vullen.

Dit is de eerste studie waarbij serum- en DBS-concentraties worden vergeleken met behulp van een formule

waarbij gecorrigeerd wordt voor zowel hematocriet als de bloedcel/serum-verdelingscoëfficiënt. Eyles e.a. [24] hebben een formule geïntroduceerd voor de conversie van DBS-concentraties naar serum- of plasmaconcentraties door te corrigeren voor de hematocriet (Hct). Deze formule kan gebruikt worden voor stoffen die zich voornamelijk in serum bevinden en waarvoor de aanwezigheid van bloedcellen enkel resulteert in verdunning van het monster: $[\text{Ana}]_{\text{p}} = [\text{Ana}]_{\text{DBS}}/(1 - \text{Hct})$. Deze formule werd gebruikt voor de vergelijking van plasma- en DBS-concentraties van propranolol [25], cocaïne [26], Δ^9 -tetrahydrocannabinol [27], imatinib, nilotinib en dasatinib [28] en mycophenolzuur [29]. Een formule van Li en Tse [12] is gebaseerd op de formule van Eyles e.a., maar bevat tevens plasma-eiwitbinding. Deze formule is gebruikt om de correlatie tussen plasma- en DBS-concentraties van nevirapine en efavirenz te beschrijven [30].

In onze studie werd van 44 patiënten (88%) minimaal 1 bruikbare DBS verkregen. De DBS-monsters van de andere 6 patiënten waren alle te klein om er een rondje van 6 mm uit te kunnen ponsen. Ook al is de monsternamen niet ingewikkeld, het blijkt van groot belang om personeel en patiënten die DBS'en gaan afnemen, goed te instrueren.

De ondergrens van 5,9 ng/mL voor endoxifenserumconcentraties, zoals gesuggereerd in de literatuur [10], is gebruikt voor het individualiseren van de dosering. Deze waarde is het resultaat van één enkele studie; er is meer klinisch onderzoek nodig om deze grenswaarde te verifiëren. Op dit moment is dit echter de enige gepubliceerde studie waar een grenswaarde bepaald is.

Bij gebruik van de conversieformule die is verkregen bij onze studie, resulteert de minimale serumconcentratie endoxifen van 5,9 ng/mL in een minimale DBS-concentratie endoxifen van 3,9 ng/mL. Voor 2 patiënten (4%) was de berekende serumconcentratie onder de grensconcentratie, maar de geanalyseerde serumconcentratie niet. De geanalyseerde concentratie lag echter dusdanig dicht bij de ondergrens dat in de praktijk de optie tot dosisverhoging ook in deze situaties met de patiënt besproken zou worden. Naar verwachting zou het resultaat in de praktijk niet verschillend zijn wanneer DBS-concentraties zouden worden gebruikt.

Conclusie

De resultaten van deze studie maken het mogelijk om DBS'en te gebruiken voor het bepalen van de concentraties van tamoxifen en endoxifen in klinische studies en voor *therapeutic drug monitoring*. DBS-concentraties waren gelijk aan serumconcentraties na correctie voor de hematocriet en voor de verhouding bloedcel/serum. DBS-concentraties kunnen gemakkelijk worden omgerekend naar serumconcentraties met gebruik van de volgende formules: $[\text{Tam}]_{\text{s,calc}} = [\text{Tam}]_{\text{DBS}}/0,779$ en $[\text{End}]_{\text{s,calc}} = [\text{End}]_{\text{DBS}}/0,663$.

Literatuur

- 1 Teunissen SF, Rosing H, Seoane MD, et al. Investigational study of tamoxifen phase I metabolites using chromatographic and spectroscopic analytical techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 jun 1;55(3):518-26.
- 2 Mürdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 mei;89(5):708-17.
- 3 Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen [4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen] has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005 mei;55(5):471-8.
- 4 Johnson MD, Zuo H, Lee KH, et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 mei;85(2):151-9.
- 5 Tamoxifen. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100a:131-53 [geraadpleegd 2015 nov 24]. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/mono100A-13.pdf>.
- 6 Jager NG, Rosing H, Schellens JH, Linn SC, Beijnen JH. Tamoxifen dose and serum concentrations of tamoxifen and six of its metabolites in routine clinical outpatient care. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 feb;143(3):477-83.
- 7 Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009 mrt 1;69(5):1722-7.
- 8 Hawse JR, Subramaniam M, Cicek M, et al. Endoxifen's molecular mechanisms of action are concentration dependent and different than that of other anti-estrogens. *PLoS One.* 2013;8(1):e54613.
- 9 Maximov PY, McDaniel RE, Fernandes DJ, et al. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *Br J Pharmacol.* 2014 dec;171(24):5624-35.
- 10 Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 mei;89(5):718-25.
- 11 Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LM. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit.* 2009 jun;31(3):327-36.
- 12 Li W, Tse FL. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr.* 2010 jan;24(1):49-65.
- 13 Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline – second edition [EP09-A2]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002 sep.
- 14 Jager NG, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH, Linn SC. Use of dried blood spots for the determination of serum concentrations of tamoxifen and endoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 jul;146(1):137-44.
- 15 Jager NG, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Determination of tamoxifen and endoxifen in dried blood spots using LC-MS/MS and the effect of coated DBS cards on recovery and matrix effects. *Bioanalysis.* 2014;6(22):2999-3009.
- 16 Jager NG, Koornstra RH, Vincent AD, et al. Hot flashes are not predictive for serum concentrations of tamoxifen and its metabolites. *BMC Cancer.* 2013 dec 28;13:612.
- 17 Jager NG, Rosing H, Linn SC, Schellens JH, Beijnen JH. Importance of highly selective LC-MS/MS analysis for the accurate quantification of tamoxifen and its metabolites: focus on endoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 jun;133(2):793-8.
- 18 Dhungana S, Meng M, Allen MS. Boost Drug Discovery Efficiency; Switching from Plasma to Dried Blood Spots [internet]. Salt Lake City: Tandem Labs; 2012 [geraadpleegd 2015 nov 24]. http://www.tandemlabs.com/documents/DBS_WhitePaper_Final.pdf.
- 19 Rowland M, Emmons GT. Use of dried blood spots in drug development: pharmacokinetic considerations. *AAPS J.* 2010 sep;12(3):290-3.
- 20 Wickremesinhe ER, Abdul BG, Huang NH, et al. Dried blood spot sampling: coupling bioanalytical feasibility, blood-plasma partitioning and transferability to in vivo preclinical studies. *Bioanalysis.* 2011 jul;3(14):1635-46.
- 21 Wickremesinhe ER, Huang NH, Abdul BG, Knotts K, Ruterbories KJ, Manro JR. Preclinical bridging studies: understanding dried blood spot and plasma exposure profiles. *Bioanalysis.* 2013 jan;5(2):159-70.
- 22 Method validation. In: Guideline on bioanalytical method validation. London: European Medicines Agency; 2011 jul 21. p. 4-10.
- 23 Le T, Bhushan V. First aid for the USMLE Step 1. 23e ed. McGraw-Hill Education; 2013.
- 24 Eyles D, Anderson C, Ko P, et al. A sensitive LC/MS/MS assay of 25OH vitamin D3 and 25OH vitamin D2 in dried blood spots. *Clin Chim Acta.* 2009 mei;403(1-2):145-51.
- 25 Della Bona ML, Malvagia S, Villanelli F, et al. A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spots. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 mei 5;78-79:34-8.
- 26 Mercolini L, Mandrioli R, Gerra G, Raggi MA. Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: a novel test for cocaine and alcohol intake. *J Chromatogr A.* 2010 nov 12;1217(46):7242-8.
- 27 Mercolini L, Mandrioli R, Sorella V, et al. Dried blood spots: liquid chromatography-mass spectrometry analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its main metabolites. *J Chromatogr A.* 2013 jan 4;1271(1):33-40.
- 28 Kralj E, Trontelj J, Pajič T, Kristl A. Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 aug 15;903:150-6.
- 29 Arpini J, Antunes MV, Pacheco LS, et al. Clinical evaluation of a dried blood spot method for determination of mycophenolic acid in renal transplant patients. *Clin Biochem.* 2013 dec;46(18):1905-8.
- 30 Kromdijk W, Mulder JW, Rosing H, Smit PM, Beijnen JH, Huitema AD. Use of dried blood spots for the determination of plasma concentrations of nevirapine and efavirenz. *J Antimicrob Chemother.* 2012 mei;67(5):1211-6.