

Nhận xét kết quả sử dụng thuật toán tomato tính liều warfarin trên bệnh nhân thay van hai lá cơ học

Lê Thị Hoa*, Phạm Thái Sơn***, Đỗ Doãn Lợi***

Kim Ngọc Thanh***, Lê Thanh Tùng***, Trương Thanh Hương***

Bác sĩ nội trú, Bộ môn Tim mạch, Đại học Y Hà Nội*

Bộ môn Tim mạch, Đại học Y Hà Nội**

Viện Tim mạch Việt Nam, Bệnh viện Bạch Mai***

TÓM TẮT

Tổng quan: Mức độ đáp ứng chống đông máu với chế độ liều cố định của warfarin ở mỗi bệnh nhân rất khó dự đoán, đặc biệt trong thời gian bắt đầu điều trị. Vì vậy, trên thế giới có nhiều thuật toán hướng dẫn tính liều Warfarin dựa trên yếu tố lâm sàng và di truyền được áp dụng để hạn chế biến chứng và nâng cao hiệu quả điều trị.

Mục tiêu: Xác định đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 bằng kỹ thuật PCR-RFLP và nhận xét kết quả của áp dụng thuật toán tính liều Warfarin dựa trên lâm sàng và kiểu gen (Thuật toán TOMATO) trên bệnh nhân thay van hai lá cơ học.

Phương pháp: 45 bệnh nhân sau thay van hai lá cơ học được lấy máu ngoại vi để xác định đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 bằng phương pháp PCR-RFLP. Khi đã có dữ liệu kiểu gen, các bệnh nhân được dùng Warfarin với liều lượng được tính theo thuật toán di truyền được lý. Sau đó việc điều trị của tất cả bệnh nhân được quản lý theo thực hành lâm sàng thường quy. Kết cục chính là đánh giá thời gian INR trong khoảng điều trị (TTR) trong 14 ngày đầu tiên dùng warfarin.

Kết quả: Khi phân tích đa hình kiểu gen phát hiện 2/45 (4,44%) người mang gen CYP2C9*3, đều ở dạng dị hợp tử, phát hiện 32/45 (71,11%) người mang kiểu gen VKORC1-AA và 12/45

(26,67%) người mang gen VKORC1-GA. Liều lượng Warfarin trung bình của nhóm bệnh nhân nghiên cứu dựa trên thuật toán TOMATO là 3,47 mg/ngày với tỷ lệ INR đạt mục tiêu là 57,6% và tỷ lệ bệnh nhân có thời gian trong khoảng điều trị >70% là 57,8%.

Kết luận: Đa hình VKORC1-AA chiếm tỷ lệ cao trong quần thể nghiên cứu. Liều lượng Warfarin dựa trên di truyền được lý có liên quan đến thời gian INR trong khoảng điều trị cao hơn so với sử dụng Warfarin theo kinh nghiệm lâm sàng.

Từ khóa: Warfarin, thay van hai lá cơ học, đa hình gen CYP2C9 và VKORC1.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, sự ra đời của thuốc kháng đông máu đường uống mới (NOACs) đã tạo ra những bước ngoặt trong việc sử dụng chống đông ở bệnh nhân tim mạch. Tuy nhiên, thuốc chống đông kháng vitamin K vẫn giữ một vai trò quan trọng. Với ưu điểm là hiệu quả chống đông cao, giá thành rẻ, thuốc chống đông kháng vitamin K vẫn là sự lựa chọn hàng đầu cho bệnh nhân rung nhĩ, huyết khối tĩnh mạch sâu và là loại thuốc kháng đông duy nhất được khuyến cáo ở bệnh nhân thay van tim nhân tạo. Tuy nhiên, thuốc lại có nhược điểm là giới hạn điều trị hẹp, bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố của môi trường và di truyền nên phải thường

xuyên theo dõi các chỉ số đông máu như INR (International normalized ratio).¹⁻⁴ Gen CYP2C9 mã hóa enzym CYP2C9 là một enzym thuộc họ Cytochrome P450, đóng vai trò quan trọng trong việc oxy hóa các hợp chất nội sinh và ngoại sinh ở gan. Giống như các thành viên CYP2C khác, CYP2C9 có tính đa hình cao, trong đó đa hình CYP2C9*3 làm thay đổi acid amin Ile359Leu, đa hình CYP2C9*2 làm thay đổi acid amin Arg144Cys đã được xác định là nguyên nhân gây chuyển hóa kém thuốc warfarin.⁵ Gen VKORC1 mã hóa cho enzym Vitamin K epoxide reductase là enzyme đích của warfarin chịu trách nhiệm chuyển hóa vitamin K dạng oxy hóa thành vitamin K dạng khử tham gia vào quá trình đông máu. Sự xuất hiện đa hình VKORC1-1639G>A sẽ làm giảm hoạt động của enzym Vitamin K epoxide reductase,⁶ do vậy cần liều thuốc warfarin thấp hơn bình thường đã đạt được hiệu quả điều trị.² Hiện nay, y học cá thể hóa trong liệu pháp điều trị đang trở thành mối quan tâm lớn đối với các nhà lâm sàng nhằm đưa ra liều điều trị tối ưu cho mỗi cá thể dựa trên đặc điểm di truyền của họ, mang lại hiệu quả điều trị cũng như hạn chế các biến chứng.

Năm 2017, FDA đã phê duyệt liều khuyến cáo của Warfarin dựa trên xét nghiệm gen CYP2C9 và VKORC1. Tổ chức Thực hành Lâm sàng Dược di truyền (CPIC) đã khuyến cáo mạnh mẽ, cách tốt nhất để tính liều Warfarin là sử dụng các thuật toán Di truyền dược lý học. Ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu như vậy, vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu với 2 mục tiêu: 1. Khảo sát tỷ lệ kiểu gen CYP2C9*3 CYP2C9*2 và VKORC1-1639G>A bằng phương pháp PCR-RFLP; 2. Nhận xét kết quả sử dụng thuật toán TOMATO tính liều Warfarin trên bệnh nhân van hai lá cơ học.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

Bệnh nhân sau thay van hai lá cơ học vì bất cứ lý do gì.

Thiết kế nghiên cứu

Mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

Chọn mẫu thuận tiện, liên tiếp có 45 bệnh nhân đủ điều kiện tham gia nghiên cứu.

Địa điểm thực hiện nghiên cứu

Viện Tim mạch Quốc gia, Bệnh viện Bạch Mai.

Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Kỹ thuật PCR-RFLP: Các alen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1 được xác định kiểu gen bằng kỹ thuật PCR và theo sau là phương pháp Đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (RFLP). Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các môi đặc hiệu và được xử lý bằng enzym cắt giới hạn *AvaII* hoặc *KpnI* để phát hiện CYP2C9*2 hoặc CYP2C9*3 với các điều kiện đã mô tả (Vu và cộng sự, 2018). Để phát hiện alen VKORC1 (-1639G/A), phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 20 µl bao gồm: 1µl DNA; 10 µl Thermo Master Mix (K0170-ThermoFisher Scientific) và 10 pmol cho mỗi môi. Chu kỳ nhiệt như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây, 56°C trong 15 giây, 72°C trong 40 giây và lần gia nhiệt cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Sau đó, 8 µl sản phẩm PCR của VKORC1 (-1639G/A) được cắt bằng enzym giới hạn *MspI* (New England Biolabs). Kết quả xác định kiểu gen sau đó được xác nhận lại bằng giải trình tự Sanger.

Thống kê xử lý số liệu

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu được biểu diễn theo trung bình ± độ lệch chuẩn đối với các biến định lượng hoặc tần số (%) đối với các biến định tính. Kiểm định Chi-Square (χ^2) được sử dụng để kiểm tra trạng thái cân bằng Hardy – Weinberg (HWE) của quần thể.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Thông số
Tuổi (năm)	50,4±8,7
Giới(nam/nữ)	16/29
BMI(kg/m ²)	21,1±2,8
Số lượng tiểu cầu(×10 ⁹ /L)	235,2±67,2
EF(%)	62,6±9,3
Đường kính nhĩ trái (mm)	46,1 ± 9,76
Rung nhĩ	21(46,7%)
Nhồi máu não	9(20%)
Van đĩa 2 cánh	45(100%)
Liều lượng Warfarin(mg)	3,47±0,87

Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 50,4 ± 8,7. Bệnh nhân chủ yếu là nữ giới chiếm 64,4%. Giá trị trung bình của thể trạng, số lượng tiểu cầu và EF trong giới hạn bình thường. Nhĩ trái không quá lớn và 100% bệnh nhân được thay loại van đĩa hai cánh, là loại van có nhiều ưu thế về huyết động và ít gây huyết khối.

Rung nhĩ và nhồi máu não là các bệnh lý hay gặp nhất của nhóm nghiên cứu.

*Bảng 2. Tần suất phân bố một số đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1*

Kiểu gen		Kiểu gen	Tỷ lệ
VKORC1-1639G>A	GG	BT	32 (71,1%)
	GA	DHT	12 (26,7%)
	AA	ĐHT	1 (2,2%)
CYP2C9*3	AA	BT	43 (95,6%)
	AC	DHT	2 (4,4%)
	CC	ĐHT	0 (0%)
CYP2C9*2	CC	BT	45 (100%)
	CT	DHT	0 (0%)
	TT	ĐHT	0 (0%)

BT: bình thường, DHT: dị hợp tử, ĐHT: đồng hợp tử

Đa hình VKORC1 xuất hiện với tỷ lệ cao trong quần thể là 97,8%, trong đó thể đồng hợp tử chiếm 71,1%, thể dị hợp tử chiếm 26,7%. Đa hình CYP2C9*3 xuất hiện với tỷ lệ 4,4%, tất cả đều ở dạng dị hợp tử. Không tìm thấy đa hình CYP2C9*2 trong quần thể.

Bảng 3. Tần số alen trong các đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1

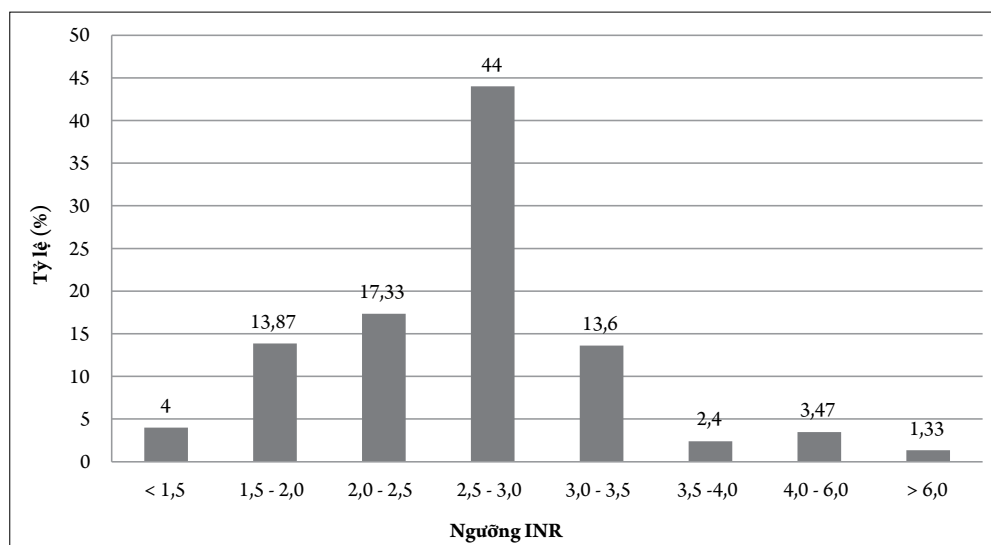
Đa hình	Tần số alen	
	Alen bình thường	Alen đa hình
CYP2C9*2	C = 100%	T = 0
CYP2C9*3	A = 98%	C = 2%
VKORC1	G = 16%	A = 84%

Đa hình VKORC1 có tần số alen đa hình cao hơn alen bình thường.

Bảng 4. Kết quả xét nghiệm INR

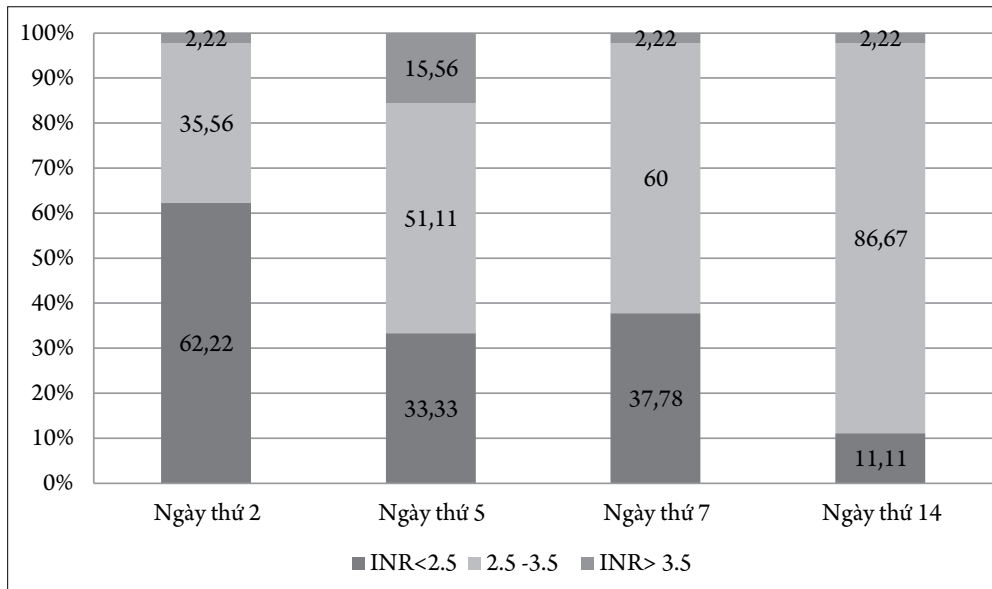
Kết quả INR	Số lần đo INR	Tỷ lệ %
Dưới mục tiêu	132	35,2
Đạt mục tiêu	216	57,6
Trên mục tiêu	27	7,2
Tổng	375	100
INR từ 2,0 - 4,0: 77,3%		
INR trung bình của quần thể: 2,67 ± 0,96 (1,1 – 10,0)		
TTR > 70%: 57,8%, TTR > 60%: 64,4%		

Tỷ lệ INR trong khoảng điều trị đạt 57,6%. Tỷ lệ INR trong khoảng chấp nhận được (INR:2-4) là 77,3%. Thời gian trong khoảng điều trị TTR>70% đạt 57,8%.



Biểu đồ 1. Kết quả xét nghiệm INR

Tỷ lệ INR từ 2,5-3,0 đạt tỷ lệ lớn nhất (44%). Chỉ có 7,2 % số INR>4.



Biểu đồ 2. Kết quả xét nghiệm INR vào các ngày xét nghiệm

Tỷ lệ bệnh nhân có INR trong khoảng điều trị tăng dần từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 14. Vào ngày xuất viện, có 86,67% bệnh nhân có INR đạt mục tiêu.

Bảng 5. Số lần chỉnh liều thuốc Warfarin

Số lần chỉnh liều	n	%
0	22	48.89
1	16	35.56
2	5	11.11
3	2	4.44
Tổng	32	100
Số lần đổi liều trên một bệnh nhân	1 ± 1	

Có gần 1 nửa số bệnh nhân không phải chỉnh liều thuốc trong suốt 2 tuần khi sử dụng thuật toán TOMATO tính liều warfarin.

BÀN LUẬN

Warfarin là một trong những thuốc được kê phổ biến nhất thế giới. Khoảng 20 triệu đơn thuốc Warfarin được kê mỗi năm ở Hoa Kỳ.⁷ Cơ chế tác động chính của thuốc warfarin là ức chế hệ thống

enzym điều hành chuỗi phản ứng hình thành một số yếu tố đông máu (II, VII, IX và X) phụ thuộc vitamin K tại gan. Chính vì vậy nó được xếp vào nhóm thuốc chống đông kháng vitamin K cùng với các thuốc khác như phenprocoumon, acenocoumarol. Warfarin có thời gian bán thải từ 25 đến 60 giờ, gấp 3-6 lần acenocoumarol chính vì thế có nồng độ ổn định hơn acenocoumarol và từ đó có kiểm soát đông máu tốt hơn warfarin đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Kiểm soát mức độ chống đông máu dựa vào thời gian prothrombin (prothrombin time – PT) hay chỉ số bình thường hóa quốc tế INR (Internatinal Normalized Ratio).

Tuy hiệu quả chống đông cao nhưng cửa sổ điều trị hẹp, với mục tiêu INR cho bệnh nhân sau thay van hai lá cơ học là 2,5 – 3,5 nên quá liều hoặc không đạt liều rất dễ xảy ra biến cố xuất huyết hoặc huyết khối. Các sự kiện bất lợi từ warfarin phổ biến hơn trong những thời gian đầu điều trị trước khi liều tối ưu được xác định.⁸⁻¹⁰ Hơn nữa, sự đáp ứng với điều trị Warfarin giữa các cá thể rất khác nhau, vì vậy cần theo dõi thường xuyên INR và điều chỉnh liều lượng. Nhiều nghiên cứu quan sát đã đánh giá nhiều

yếu tố lâm sàng và di truyền liên quan đến yêu cầu về liều lượng warfarin.

Trong các yếu tố di truyền được nghiên cứu thì đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1 được chứng minh có ảnh hưởng nhất đến sự khác nhau về liều lượng Warfarin giữa các cá thể, đóng góp 40% sự thay đổi của liều Warfarin.^{11,12} Dữ liệu cho thấy tầm quan trọng của những đa hình này mà Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ năm 2017 đã thay đổi nhãn thuốc cho warfarin và đưa ra khuyến nghị, “chọn liều khởi đầu của Warfarin dựa trên sự kết hợp khác nhau của các kiểu gen CYP2C9 và VKORC1”. Năm 2017, Tổ chức Thực hành Lâm sàng Dược di truyền (CPIC) đã đưa ra khuyến cáo, cách tốt nhất tính liều warfarin cho bệnh nhân là sử dụng các thuật toán Di truyền dược lý.¹³

Thuật toán TOMATO¹⁴ là một trong hai thuật toán tính liều warfarin được CPIC khuyến cáo sử dụng. Thuật toán dễ tiếp cận, dễ sử dụng, có thể truy cập online tại Warfarindosing.org. Thuật toán sử dụng các yếu tố lâm sàng được chứng minh ảnh hưởng đến liều lượng Warfarin của mỗi cá nhân bao gồm: tuổi, giới, dân tộc, cân nặng, chiều cao, các thuốc dùng tương tác với Warfarin (Amiodaron, Statin, Aspirin, các thuốc nhóm Azol hay Biseptol), đích INR cần đạt. Các yếu tố di truyền là kiểu gen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1.¹⁴

Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành trên 45 bệnh nhân sau thay van hai lá cơ học, chúng tôi xác định đa hình gen CYP2C9*2, CYP2C9*3 và VKORC1 bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả cho thấy gen VKORC1- 1639G>A có tỷ lệ đồng hợp đột biến chiếm tỷ lệ lớn nhất 71,1%, sau đó đến dị hợp đột biến chiếm 26,7%, đồng hợp kiểu dại chiếm ít nhất là 2,2%. Gen CYP2C9*3 có 4,4% thể dị hợp đột biến, còn lại là đồng hợp kiểu dại, không có bệnh nhân nào mang gen đồng hợp đột biến. Với gen CYP2C9*2 không phát hiện bệnh nhân mang đột

biến, tất cả quần thể đều mang kiểu gen dại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự các nghiên cứu trong nước như: Nghiên cứu của Phạm Thị Thùy và cộng sự trên 100 bệnh nhân dùng acenocoumarol (2018), nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hoa và cộng sự trên 100 bệnh nhân đái tháo đường typ 2 (2018), nghiên cứu của Đỗ Thị Lệ Hằng và cộng sự trên 100 bệnh nhân sử dụng acenocoumarol (2018). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới khi cho rằng gen VKORC1 có hơn 80% người Đông Nam Á có kiểu gen đồng hợp đột biến, trong khi các nước châu Âu và châu Phi có tỷ lệ thấp hơn.¹⁵ Ngược lại, đa hình CYP2C9 hay gặp hơn ở người châu Âu và ít gặp ở người châu Á. Đặc biệt trong nhiều nghiên cứu không bắt gặp đa hình CYP2C9*2 ở quần thể châu Á.¹⁵ Qua đây ta thấy sự phân bố kiểu gen và alen của CYP2C9 và VKORC1 phụ thuộc vào sự khác nhau giữa khu vực, quốc gia, dân tộc.

Khi áp dụng thuật toán TOMATO tính liều Warfarin trong nghiên cứu, liều warfarin trung bình sử dụng cho các bệnh nhân là $3,47 \pm 0,87$ mg/ngày. Khi áp dụng thuật toán TOMATO tính liều warfarin, thử nghiệm của chúng tôi cho thấy rằng liều lượng dựa trên kiểu gen khi bắt đầu điều trị bằng warfarin làm tăng thời gian trong phạm vi điều trị (kết cục chính) lên và giảm tỷ lệ kháng đông quá mức, thời gian cần thiết để đạt được INR điều trị và số lần điều chỉnh liều warfarin so với hầu hết các nghiên cứu tương tự ở Việt Nam từ trước tới nay.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 45 bệnh nhân sau thay van hai lá cơ học, độ tuổi trung bình là $50,4 \pm 8,7$; dùng Warfarin theo hướng dẫn tính liều dựa vào thuật toán TOMATO: Tần suất phân bố của các đa hình được nghiên cứu: đa hình VKORC1 gặp xấp xỉ 98% trong quần thể nghiên cứu, đa hình CYP2C9*3 xuất hiện với tỷ lệ 4,4%. Không phát hiện đa hình

CYP2C9*2 trong quần thể nghiên cứu. Việc sử dụng thuật toán TOMATO tính liều Warfarin cho kết quả tăng thời gian trong phạm vi điều trị (kết cục chính) lên và giảm tỷ lệ kháng đông quá mức,

thời gian cần thiết để đạt được INR điều trị, thời gian cần thiết để đạt được liều ổn định và số lần điều chỉnh liều warfarin so với hầu hết các nghiên cứu tương tự ở Việt Nam từ trước tới nay.

ABSTRACT

The results of tomato algorithm in calculating dose of warfarin in the patients with mechanical mitral valve replacement

Overview: Respond of every patient to the fixed dose regime of warfarin is difficult to estimate, especially during the initial treatment. Therefore, in the world, many algorithms were create to calculate Warfarin dose based on clinical and genetic factors to restrict complications and improve treatment outcome.

Objective: Identify the CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 polymorphisms by PCR-RFLP technique and comment on results of the Warfarin dosing algorithm based on clinical features and genotypes (TOMATO algorithm) in patients with mechanical mitral valve replacement.

Methods: 45 patients after mechanical mitral valve replacement were drawn peripheral blood to determine polymorphism of genes CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1 by PCR-RFLP. Once genotype data were available, the patients have received initial warfarin dose based on pharmacogenetic algorithm. Thereafter, the treatment of all patients were managed according to routine clinical practice. The primary outcome was evaluated by the percentage of time of treatment that their INR (international normalized ratio) between 2.5 and 3.5 for the first 14 days after warfarin starting dose.

Results: About genotype polymorphisms, 2/45 (4.44%) carriers of the CYP2C9*3 gene were found to be heterozygous, and 32/45 (71.11%) carriers with VKORC1-AA and 12/45 (26.67%) carriers of VKORC1- GA. The mean Warfarin dose of research group of patients using the TOMATO algorithm was 3.47 mg/day with a target INR of 57.6% and the proportion of period of treatment with a therapeutic INR > 70% was 57.6%.

Conclusion: VKORC1- AA polymorphism accounts for a high percentage in the study population. Warfarin dosages based on pharmacogenetics were associated with a higher percentage of the time in the therapeutic INR than the standard dose regarding initiation of warfarin therapy.

Keywords: Warfarin, mechanical mitral valve replacement, CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphism.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trailokya A, Hiremath JS, Sawhney J, et al. Acenocoumarol: A Review of Anticoagulant Efficacy and Safety. *The Journal of the Association of Physicians of India*. Feb 2016;64(2):88-93.
2. Buzoianu AD, Militaru FC, Vesa SC, Trifa AP, Crişan S. The impact of the CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on acenocoumarol dose requirements in a Romanian population. *Blood cells, molecules & diseases*. Mar 2013;50(3):166-70. doi:10.1016/j.bcmed.2012.10.010.
3. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *The pharmacogenomics journal*. Apr 2007;7(2):99-111. doi:10.1038/sj.tpj.6500417.

4. **Hylek EM.** Complications of oral anticoagulant therapy: bleeding and nonbleeding, rates and risk factors. *Seminars in vascular medicine.* Aug 2003;3(3):271-8. doi:10.1055/s-2003-44463.
5. **Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al.** Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *Jama.* Apr 3 2002;287(13):1690-8. doi:10.1001/jama.287.13.1690.
6. **Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al.** Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *The New England journal of medicine.* Jun 2 2005;352(22):2285-93. doi:10.1056/NEJMoa044503.
7. **Shaw K, Amstutz U, Kim RB, et al.** Clinical Practice Recommendations on Genetic Testing of CYP2C9 and VKORC1 Variants in Warfarin Therapy. *Ther Drug Monit.* Aug 2015;37(4):428-36. doi:10.1097/ftd.000000000000192.
8. **Fihn SD, McDonnell M, Martin D, et al.** Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. *Annals of internal medicine.* Apr 1 1993;118(7):511-20. doi:10.7326/0003-4819-118-7-199304010-00005.
9. **Landefeld CS, Beyth RJ.** Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *The American journal of medicine.* Sep 1993;95(3):315-28. doi:10.1016/0002-9343(93)90285-w.
10. **Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL.** Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thrombosis and haemostasis.* Jan 2004;91(1):87-94. doi:10.1160/th03-06-0379.
11. **Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, et al.** The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood.* Jan 22 2009;113(4):784-92. doi:10.1182/blood-2008-04-149070
12. Estimation of the Warfarin Dose with Clinical and Pharmacogenetic Data. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(8):753-764. doi:10.1056/NEJMoa0809329.
13. **Johnson JA, Caudle KE, Gong L, et al.** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clinical pharmacology and therapeutics.* Sep 2017;102(3):397-404. doi:10.1002/cpt.668.
14. **Gage BF, Eby C, Johnson JA, et al.** Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clinical pharmacology and therapeutics.* Sep 2008;84(3):326-31. doi:10.1038/clpt.2008.10.
15. **Jonas DE, Evans JP, McLeod HL, et al.** Impact of genotype-guided dosing on anticoagulation visits for adults starting warfarin: a randomized controlled trial. *Pharmacogenomics.* Oct 2013;14(13):1593-603. doi:10.2217/pgs.13.145.