

Study of polymorphism frequency of 1639G> A gene from VKORC1 in patients with cardiovascular disorders in the northwestern area of Iran

Tabatabaei SM(PhD)¹, Monfaredan A(M.Sc)^{2*}, Bargahi N(M.Sc)³, Dabiri-Oskuei S(PhD)⁴

1- Department of Physiology, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Department of Lab Sciences and Microbiology, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Department of Molecular Genetics, Tabriz University, Tabriz, Iran

4- Department of Nuclear Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 9 Jun 2011, Accepted: 1 Nov 2011

Abstract

Background: In addition to known environmental and acquired factors effective in cardiovascular diseases, polymorphisms of VKORC1 and CYP2C9 genes are identified as the main genetic factors involved in warfarin dosage requirement variations in these patients. With this approach, investigating the frequency of 1639 G>A in VKORC1 gene for determining the specific dosage required for each person was the main aim of this study.

Materials and Methods: In this experimental study, peripheral blood samples were obtained from 200 patients with cardiovascular disorders in the northwestern areas of Iran (West and East Azarbayjan and Ardabil) and RFLP-PCR technique was used to determine the 1639G> A polymorphism of VKORC1.

Results: Using Hardy-Weinberg law, polymorphism amounts of 1639G> A gene from VKORC1 in female and male patients with normal, heterozygote, and homozygote were determined 21.6%, 53.7%, 24.5% , and 22.3%, 60.6%, and 17.02% , respectively.

Conclusion: VKORC1 genotyping is one of the important parameters that together with other confounding factors reduce the role of trial and error in patients with cardiovascular diseases. Genotypic variety and the high frequency of allele A in the studied population can justify varied responses to warfarin therapy and the importance of investigation before starting treatment with warfarin.

Keywords: Optimum dosage, Polymorphism, Warfarin

*Corresponding author:

Address: Department of Lab Sciences and Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

Email: amir.monfaredan@yahoo.com

بررسی فراوانی پلی مورفیسم $1639G>A$ ژن $VKORC1$ در بیماران با سابقه اختلالات قلبی - عروقی منطقه شمال غرب ایران

سید محمود طباطبائی¹، امیر منفردان^{2*}، نسرين بارگاهی³، شهرام دبیری اسکویی⁴

- 1- استادیار، دکترای تخصصی نوروساینس، گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران
- 2- کارشناسی ارشد هماتولوژی، گروه علوم آزمایشگاهی و میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران
- 3- کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات دارویی پشمینه، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- 4- استاد، دکترای تخصصی طب هسته‌ای، گروه طب هسته‌ای، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: 90/3/20 تاریخ پذیرش: 90/8/11

چکیده

زمینه و هدف: علاوه بر عوامل اکتسابی و محیطی موثر شناخته شده در بیماری‌های قلبی عروقی (CVD)، پلی مورفیسم دو ژن $VKORC1$ و $CYP2C9$ ، به عنوان اصلی‌ترین عوامل ژنتیکی دخیل در تغییرات دوز مورد نیاز وارفارین در این بیماران، شناسایی شده است. با این رویکرد بررسی فراوانی $G1639A$ در ژن $VKORC1$ جهت تعیین دوز اختصاصی مورد نیاز هر فرد، به عنوان هدف اصلی این مطالعه مد نظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از 200 بیمار با اختلالات قلبی عروقی در منطقه شمال غرب کشور (شامل استان‌های آذربایجان شرقی و غربی و اردبیل) خون‌گیری وریدی به عمل آمد و با استفاده از تکنیک RFLP-PCR نسبت به تعیین پلی مورفیسم $1639G>A$ ژن $VKORC1$ اقدام گردید.

یافته‌ها: با استفاده از قانون هاردی وینبرگ، میزان فراوانی پلی مورفیسم و نوع ژنوتیپ درگیر $1639G>A$ در دو جنس مونث و مذکر ژنوتیپ نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت به ترتیب $21/6$ ، $53/7$ و $24/5$ درصد در زنان و $60/6$ ، $22/3$ و $17/02$ درصد در مردان مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تعیین ژنوتیپ $VKORC1$ یکی از عوامل مهم تاثیرگذار بوده که به همراه سایر عوامل مداخله‌گر، بحث آزمون و خطا را در بیماران قلبی عروقی تا حد ممکن کاهش می‌دهد. تفاوت‌های ژنوتیپی و فراوانی بالای A ، می‌تواند پاسخ‌های متنوع در قبال درمان با وارفارین و اهمیت بررسی قبل از شروع درمان با وارفارین را توجیه نماید.

واژگان کلیدی: دوز بهینه، چند شکلی ژنتیکی، وارفارین

* نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی و میکروبیولوژی

Email: amir.monfaredan@yahoo.com

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی (Cardio vascular Disease-CVD) به مجموعه‌ای از اختلالات عملکردی قلب، شریان‌ها و وریدها اطلاق می‌شود. ترومبوز به عنوان مهم‌ترین عامل موثر در بروز این بیماری‌ها در سراسر دنیا به شمار می‌رود. این آسیب‌ها می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی و یا تغییرات اکتسابی دخیل در سیستم انعقادی خون باشد (1).

وارفارین و آسپیرین شاید بهترین داروهایی باشند که به عنوان مهار کننده‌های ثانویه بیماری‌های آترو ترومبوتیک به شمار می‌روند و استفاده از این داروها میزان آسیب‌های ترومبوآمبولیک را به صورت چشم‌گیری کاهش داده‌اند (1-4). با این حال مصرف داروهای ضد انعقاد بین بیماران، پاسخ‌های متفاوتی به دنبال داشته و به کار گرفتن درمان‌هایی از این قبیل به غربال‌گری دقیق INR (International Normalized Ratio) نیاز مبرم دارد. علاوه بر تاثیرپذیری درمان از تنظیم دوزاژ، در 50 درصد موارد، مبنای تنظیم دوزاژ بر اساس INR، خارج از مبنای محدوده واقعی قرار می‌گیرد و همین موضوع منجر به ناموفق ماندن درمان و یا بروز وقایع جبران ناپذیری می‌گردد (5، 6).

وارفارین وسیع‌الطیف‌ترین داروی ضد انعقاد خوراکی بوده و میزان دوزاژ مورد نیاز در بین افراد مختلف، تحت تاثیر چندین عامل از قبیل نحوه تغذیه، وزن، استعمال دخانیات، تغییرات فارماکوکنتیک، فارماکودینامیک و سایر موارد متغیر است. این امر حتی در یک فرد در شرایط فیزیولوژیکی مختلف نیز متفاوت می‌باشد (7). با توجه به این که تغییرات دوزاژ در بین افراد مختلف متفاوت بوده و بیماران را مستعد خونریزی‌های خطرناک می‌کند، تنظیم دوزاژ مورد نیاز برای درمان با وارفارین همواره با چالش همراه است (8-10). خونریزی به عنوان پیچیده‌ترین مشکل در مقابل درمان با داروهای ضد انعقاد خوراکی مطرح است (11)، علاوه بر عوامل اکتسابی و محیطی موثر شناخته شده در تغییرات دوزاژ مورد نیاز وارفارین، پلی‌مورفیسم دو ژن $VKORC1$ (Vitamin K epoxide reductase)

(complex1) و $CYP2C9$ (Cytochrome P450 2C9)

به عنوان اصلی‌ترین عوامل ژنتیکی دخیل، شناسایی شده‌اند. داروی ضد انعقاد وارفارین باعث مهار مجموعه احیاکننده آپوکسید ویتامین K شده و مانع بازگشت ویتامین K احیا شده به فرایند طبیعی انعقاد می‌شود و با این مکانیسم خاصیت ضد انعقادی خود را اعمال می‌کند. حضور پلی‌مورفیسم $1639G>A$ در ژن $VKORC1$ باعث کاهش میزان وارفارین دریافتی مورد نیاز در بیماران خواهد شد (14-12).

وارفارین یکی از مشتقات کومارین‌ها به شمار می‌رود، آنزیم ردوکتاز آپوکسید ویتامین K مسئول بازگرداندن ویتامین K آپوکسید به ویتامین K هیدروکینون می‌شود که به عنوان کوفاکتور اصلی در گاما کربوکسیلاسیون عوامل انعقادی 2، 7، 9 و 10 نقشی اساسی دارد (15-18).

تغییرات ژنتیکی در ژن کد کننده این آنزیم ($VKORC1$) متفاوت بودن حساسیت به وارفارین را به دنبال دارد. برای تصدیق این گفتار ثابت شده است که بروز جهش‌هایی در ساختار ژن $VKORC1$ به صورت ثانویه، عامل اختلال عوامل انعقادی و هم‌چنین ایجاد مقاومت به وارفارین به شمار می‌آید (19، 20). مطالعات بالینی متفاوتی در مناطق جغرافیایی مختلف حضور ارتباط معنی‌داری را بین نوع پلی‌مورفیسم این ژن و میزان دوزاژ مورد نیاز وارفارین مشخص کرده است (21).

پلی‌مورفیسم $1639G>A$ در این ژن در ناحیه پروموتور قرار دارد. این پلی‌مورفیسم از نظر کیفیت و کمیت، میزان بیان آنزیم ردوکتاز آپوکسید ویتامین K را تغییر می‌دهد (22).

پروموتور ژن $VKORC1$ با حضور نوکلئوتید G در ردیف 1639، در حدود 44 درصد افزایش فعالیت نسبت به حضور نوکلئوتید A را نشان می‌دهد (22)، بنابراین پلی‌مورفیسم $1639G>A$ از فعالیت پروموتوری این ژن کاسته و به دنبال آن سطح بیان mRNA و پروتئین این ژن کاهش می‌یابد. از این جهت تعیین این پلی‌مورفیسم شاید بتواند تفاوت افراد در پاسخ متفاوت به وارفارین را توجیه نماید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی با رویکرد تعیین فراوانی پلی مورفیسم A>G1639 در بین 200 بیمار مبتلا به اختلالات قلبی عروقی که توسط متخصصین قلب و عروق به مرکز تشخیص طبی پلاسمای تبریز ارجاع داده شده بودند، انجام گرفت. از بیماران مراجعه کننده به مرکز آزمایشگاهی تبریز رضایت نامه کتبی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز (به شماره 8940 مورخ 89/9/15)، اخذ شد و با توضیح برای لزوم انجام کار، پرسشنامه اختصاصی طراحی شده، تکمیل گردید. INR این بیماران طوری انتخاب شد که از INR پایه که 2 مدنظر بود، حداقل 1/5 واحد متفاوت باشد. معیار ورود نمونه به این بررسی، تشخیص CAD با استفاده از آنژیوپلاستی و معیار خروج نمونه‌ها، سابقه انفارکتوس قلبی بیشتر از 2 مورد و سابقه مصرف سیگار بیشتر از 20 سال مد نظر بود. فاصله INR مابین 3/5 الی 7 در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از سیستم و کیوم شرکت تریمو ژاپن خون‌گیری وریدی به عمل آمد. DNA ژنومیک از گلبول‌های سفید به صورت مستقیم با استفاده از کیت QIAamp DNA Blood Mini Kit (کیازن) و با استفاده از پروتکل پیشنهادی این کیت استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از 120 نانوگرم DNA ژنومیک در محیط حاوی 10 میلی مول مخلوط dNTP شرکت تاکارای ژاپن، 0/5 میکرومول از پرایمرهای تکثیر دهنده قطعه DNA مدنظر شامل پرایمر رفت با توالی GCCAGCAGGAGAGGGAAATA و پرایمر برگشت با توالی AGTTTGGACTACAGGTGCCT، 1 واحد از آنزیم Taq Polymerase شرکت تاکارای ژاپن، 2/5 میکرولیتر از بافر 10X محتوی TAPS (pH=9 /3) و DNA و مرکاپتواتانول به میزان 0/25 میلی گرم در میلی لیتر و 1/25 میکرولیتر از $MgCl_2$ 50 میلی مول در حجم نهایی 25 میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر تاکارای ژاپن انجام گرفت.

پس از تکثیر قطعه DNA مورد نظر، تعیین ژنوتیپ A>G1639 بر اساس قطعات حاصل از برش با استفاده از آنزیم MSPI شرکت فرمنتاز فرانسه (-PCR/RFLP) انجام گرفت. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز محصولات به دست آمده که به اندازه 288 جفت باز بودند، تحت تاثیر این آنزیم برش داده شدند. شرایط برش به ترتیب زیر اعمال شد:

10 میکرولیتر از محصول PCR کنترل شده، 18 میکرولیتر آب مقطر، 2 میکرولیتر بافر تانگو و 1 میکرولیتر آنزیم MSPI. این ترکیب پس از مخلوط شدن به صورت کامل، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 ساعت انکوبه شده و محصولات حاصل از برش بر روی ژل پلی‌اکریلامید 10 درصد در کنار مارکر 50 جفت بازی شرکت فرمنتاز فرانسه الکتروفورز گردید و الگوی به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

جهت مقایسه فراوانی ژنوتیپ در دو گروه مونث و مذکر، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه 15 آزمون کای اسکوتر انجام شد.

پارامترهای نرم افزار بیوانفورماتیک وارفارین دوزاژینگ دانشگاه واشنگتن به آدرس اینترنتی <http://warfarindosing.org> مبنای تحقیق حاضر قرار گرفت. بر این اساس پرسش‌نامه‌های مناسب طراحی و توسط بیماران شرکت کننده در این مطالعه تکمیل گردید. از مهم‌ترین این پارامترها تعیین پلی‌مورفیسم A>G1639 در ژن VKORC1 به حساب می‌آمد. به این منظور این بررسی در اولویت قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده حاصل از برش آنزیمی برای تعیین ژنوتیپ دو گروه مونث و مذکر، با استفاده از روش PCR-RFLP مورد تفسیر قرار گرفت. الگوی مورد انتظار پس از انجام برش توسط MSPI به شرح زیر بود:

حالت طبیعی (حضور نوکلوتید G در ردیف 1639): دو محصول به اندازه‌های 120 و 168 جفت بازی.

بحث

بیماری‌های قلبی عروقی در حال تبدیل شدن به اصلی‌ترین عامل مرگ و میر و ناتوانی بشر در اغلب کشورهای جهان هستند (1). این بیماری‌ها در حال حاضر جزو سه علت اول مرگ و میر و ناتوانی انسان در سراسر دنیا هستند. در گذشته بیماری‌های عفونی و واگیر عامل عمده مرگ و میرهای بشر بودند، اما امروزه بیماری‌های غیرواگیر تبدیل به عوامل خطرناک‌تر شده‌اند (3). این آسیب‌ها می‌تواند ناشی از عوامل ژنتیکی و تغییرات اکتسابی دخیل در سیستم انعقاد خون باشد. علاوه بر عوامل اکتسابی و محیطی موثر شناخته شده، پلی مورفیسم دو ژن VKORC1 و CYP2C9، به عنوان اصلی‌ترین عوامل ژنتیکی دخیل در تغییرات دوزاژ مورد نیاز وارفارین در این بیماران، شناسایی شده است (4).

آنزیم VKORC1 و پلی مورفیسم‌های شایع این ژن می‌توانند از چندین نظر هدف مطالعات بالینی قرار گیرند، اول آن که تغییرات پلی مورفیک این ژن در میزان بیان و در نتیجه محصولات پروتئینی آن تاثیرگذار است، از این رو تعیین جهش‌های ژنی منجر به تغییر بیان، می‌تواند میزان فعالیت این آنزیم مهم در متابولیسم ویتامین K را مشخص کند.

نکته حائز اهمیت در این بحث آن است که در مطالعات اجرا شده قبلی در سطح جوامع بین المللی، همسانی در میزان تاثیر پلی مورفیسم بر بیان ژن به خوبی مشخص نشده است (جدول 2).

حالت جهش یافته (حضور نوکلوتید A در ردیف 1639): قطعه‌ای به اندازه 288 جفت باز به دلیل عدم برش محصول PCR توسط آنزیم MSPI .

حالت جهش یافته هتروزیگوت (حضور نوکلوتید A و G در دو ال در ردیف 1639): سه محصول به اندازه‌های 120، 168 و 288 جفت بازی.

با استفاده از قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی پلی مورفیسم و نوع ژنوتیپ درگیر A>G1639 در دو جنس مونث و مذکر در منطقه شمال غرب کشور (شامل استان‌های آذربایجان شرقی و غربی و اردبیل) به ترتیب ژنوتیپ طبیعی، هتروزیگوت و هموزیگوت 21/6، 53/7 و 24/5 درصد در زنان و 22/3، 60/6 و 17/02 درصد در مردان مشاهده شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری در میزان فراوانی ال جهش یافته پلی مورفیسم A>G1639 در دو جنس وجود ندارد (جدول 1).

جدول 1. مقایسه فراوانی ژنوتیپ A>G1639 در دو گروه مونث و مذکر

ژنوتیپ جنسیت	VKORC1 (1639AA) هموزیگوت	VKORC1 (1639GA) هتروزیگوت	VKORC1 (1639GG) طبیعی
مرد (درصد)	16(17/02)	57(60/6)	21(22/3)
زن (درصد)	26(24/5)	57(53/7)	23(21/6)
P	>0/05	>0/05	>0/05

نتایج نشان می‌دهد که تغییر در توالی VKORC1 اثر بیشتری بر روی دوز مورد نیاز وارفارین دارد.

جدول 2. میزان فراوانی های مشاهده شده و مورد انتظار جهش G1639A آنزیم VKORC1 در بین جوامع مختلف در مقایسه با مطالعه حاضر (20:19)

ژنوتیپ G1639A VKORC1 rs9923231	افریقای - آمریکایی (تعداد=300)	آسیایی (تعداد=102)	سفید پوستان قفقازی (تعداد=106)	اسپانیایی (تعداد=101)	یهودی (تعداد=202)	شمالغرب ایران (مطالعه حاضر) (تعداد=200)
G/G	(5/79)3/80	(1/11)5/22	(3/35)8/36	(8/31)7/30	(4/28)2/29	(25/20)16/19
G/A	(3/19)7/17	(4/44)6/21	(2/48)3/45	(2/49)5/51	(8/49)1/48	(5/49)3/53
A/A	(2/1)0/2	(4/44)9/55	(5/16)9/17	(0/19)8/17	(8/21)7/22	(25/30)5/27

متنوع در قبال درمان با وارفارین و اهمیت بررسی قبل از شروع درمان با وارفارین را توجیه نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه طرح پژوهشی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به شماره 19127-5-17-02 می‌باشد بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Drapkin A, Merskey C. Anticoagulant therapy after acute myocardial infarction. JAMA: the journal of the American Medical Association. 1972; 222(5): 541-8.
2. Group AR. Effect of long-term oral anticoagulant treatment on mortality and cardiovascular morbidity after myocardial infarction. Lancet. 1994; 343: 499-503.
3. Smith P, Arnesen H, Holme I. The effect of warfarin on mortality and reinfarction after myocardial infarction. New England Journal of Medicine. 1990; 323(3): 147-52.
4. Asinger RW, Mikell FL, Elspenger J, Hodges M. Incidence of left-ventricular thrombosis after acute transmural myocardial infarction. New England Journal of Medicine. 1981;305(6):297-302.
5. Gottlieb LK, Salem-Schatz S. Anticoagulation in atrial fibrillation: does efficacy in clinical trials translate into effectiveness in practice? Archives of internal medicine. 1994;154(17):1945-53.
6. James A, Britt R, Raskino C, Thompson S. Factors affecting the maintenance dose of warfarin. Journal of clinical pathology. 1992;45(8):704-6.
7. Hallak H, Wedlund P, Modi M, Patel I, Lewis G, Woodruff B, et al. High clearance of (S)-warfarin in a warfarin-resistant subject. British journal of clinical pharmacology. 1993;35(3):327-30.
8. Gulløv AL, Koefoed BG, Petersen P. Bleeding complications to long-term oral anticoagulant therapy. Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 1994;1(1):17-25.

اخیراً در یک مطالعه، اسشال کمپ، افزایش زمان رسیدن به دوز ثابت در بیماران با واریانت CYP2C9 را گزارش کرده است، اما هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در میان گروه‌های هاپلوتیپ VKORC1 در بیمارانی که acenocoumoral مصرف می‌کنند گزارش نشده است که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر برای بیماران وارفارینی مطابقت دارد(23-26). به علاوه، اسشلمن و همکاران، عدم وجود تفاوت معنی‌داری میان وضعیت VKORC1 و زمان رسیدن به دوز ثابت وارفارین در جمعیت قفقازی را بیان کردند(27) در حالی که تحقیق حاضر نمی‌تواند به صورت مشخص با این مطالعه وارد مقایسه شود؛ چرا که این مطالعه مقدمه‌ای بر بررسی تاثیر نوع و فراوانی پلی مورفیسم در زمان رسیدن به دوز ثابت وارفارین می‌باشد.

هدف بعدی، پی بردن به چگونگی تاثیر پلی مورفیسم این ژن در نحوه بیان آن در منطقه شمال غرب ایران و به دنبال آن تغییرات بیان ژن و تاثیر این تغییر در سطح پروتئینی است. برای رسیدن به این منظور، اولین قدم، تعیین میزان فراوانی پلی مورفیسم مدنظر ($1639G>A$) به صورت مطالعات جمعیتی می‌باشد.

در این مطالعه میزان فراوانی به دست آمده برای پلی مورفیسم ($1639G>A$)، حاکی از حضور شایع جهش در منطقه مورد بررسی است. اما این که این میزان فراوانی چشم‌گیر، تا چه اندازه بر میزان بیان ژن VKORC1 و در نتیجه فعالیت آنزیماتیک آن تاثیر گذار است قدم بعدی همکاران در این مطالعه می‌باشد.

مقایسه فراوانی ژنوتیپ ژن‌های مختلف و برقراری ارتباط مابین ژنوتیپ و فنوتیپ بیماری، موضوعی است که همواره مدنظر پروژه‌های مختلف تحقیقاتی و بالینی قرار گرفته است، چرا که با برقراری چنین ارتباط‌هایی حالت آینده‌نگری تغییرات فنوتیپی قابل دسترس خواهد بود.

نتیجه‌گیری

تفاوت‌های ژنوتیپی و فراوانی بالای ال A مورد مشاهده در جامعه آماری مورد مطالعه، می‌تواند پاسخ‌های

9. Reynolds KK, Valdes Jr R, Hartung BR, Linder MW. Individualizing warfarin therapy. *Personalized Medicine*. 2007;4(1):11-31.
10. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005;106(7):2329-33.
11. Tham LS, Goh BC, Nafziger A, Guo JY, Wang LZ, Soong R, et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;80(4):346-55.
12. Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9 2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics*. 1997;7(3): 203-10.
13. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *The Lancet*. 1999; 353(9154):717-9.
14. Nelsestuen GL, Zytovicz TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(19):6347-50.
15. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1974; 71(7):2730-3.
16. Suttie J. The biochemical basis of warfarin therapy. *Advances in experimental medicine and biology*. 1987;214:3-16.
17. Zimmermann A, Matschiner JT. Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochemical pharmacology*. 1974;23(6):1033-40.
18. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005;105(2):645-9.
19. Rost S, Fregin A, Ivaskевичius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004;427(6974):537-41.
20. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 2004;427(6974):541-4.
21. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(22):2285-93.
22. Yuan HY, Chen JJ, Lee MTM, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Human molecular genetics*. 2005;14(13):1745-51.
23. Schalekamp T, Boink GJJ, Visser LE, Stricker BHC, de Boer A, Klungel OH. CYP2C9 genotyping in acenocoumarol treatment: Is it a cost-effective addition to international normalized ratio monitoring? *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 79(6): 511-20.
24. Schalekamp T, Brassé BP, Roijers JFM, Chahid Y, van Geest-Daalderop JHH, de Vries-Goldschmeding H, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;80(1):13-22.
25. Schalekamp T, Brassé BP, Roijers JFM, van Meegen E, van der Meer FJM, van Wijk EM, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and phenprocoumon anticoagulation status: interaction between both genotypes affects dose requirement. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;81(2):185-93.
26. Schalekamp T, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, et al. Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C9 carriers. *ClinPharmacolTher*. 2004; 75:394-402.
27. Schelleman H, Chen Z, Kealey C, Whitehead A, Christie J, Price M, et al. Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 81(5):742-7.