

# Consecințe cantitative ale modelului farmacologic al acțiunii anticoagulantelor orale explorate prin simulare computerizată

A.D. Corlan\*, I. Corlan\*\*, C. Constantinescu†

\* Academia de Științe Medicale, Spitalul Universitar București, Clinica de Cardiologie

\*\* UMF ‘Carol Davila’, Spitalul Universitar București, Clinica de Cardiologie

† UMF ‘Carol Davila’, Catedra de Farmacologie

— postprint —

Terapeutică, Farmacologie și Toxicologie Clinică, vol. 7, nr. 3, pp. 39–53, 2003.

Controlul răspunsului terapeutic la administrarea anticoagulantelor orale constituie o problemă încă nerezolvată satisfăcător, peste 6% din pacienții anticoagulați suferind anual un eveniment hemoragic major, aproape 1% decedând ca urmare a tratamentului, iar nivelul de anticoagulare fiind menținut între limite terapeutice, în ansamblu, doar 60% din timp.

Numeroase studii recente prezintă rezultate cantitative ale unor aspecte izolate de farmacocinetică și farmacodinamică a anticoagulantelor orale. Sistemul de simulare prezentat în această lucrare integrează rezultatele privind: absorbția și distribuția enantiomerilor R și S ai acenocumarolului și warfarinei, varietățile genetice ale eliminării acestora datorate mutațiilor genetice ale citocromului P-450 (CYP2C9), efectul asupra vitamin-K<sub>1</sub>-2,3-epoxid reductazei și modificările cantitative în metabolismul vitaminei K, efectul scăderii concentrației vitaminei-KH<sub>2</sub> asupra sintezei factorilor II, VII, IX și X, proteinei C și proteinei S, efectul sintezei și eliminării diferite a acestora asupra valorii raportului INR.

Cu acest simulator sunt explorate prin prisma efectului asupra INR scenarii de administrare a anticoagulantelor orale cu diverse regimuri în funcție de parametri genetici și constituționali. S-a putut reproduce evoluția obișnuită, la majoritatea pacienților, a INR-ului sub tratament. Scăderea activității CYP2C9 s-a însoțit de schimbarea raportului între concentrațiile plasmatică de enantiomeri S- și R-warfarină, conform literaturii. Simularea administrării de regimuri de întreținere de acenocumarol cu doză variabilă de la o zi la alta, cum ar fi 2-2-2-2-1, precum și neadministrarea dozelor la ore fixe au avut drept efect o creștere a oscilațiilor INR în cursul tratamentului de întreținere de până la trei ori față de administrarea unei doze fixe la o oră fixă.

Adresa pentru corespondență: Dr. Alexandru Corlan,  
Spitalul Universitar București, Splaiul Independenței 169,  
Clinica de Cardiologie, et X, camera 41.  
<http://dan.corlan.net>

## 1 Introducere

Variabilitatea răspunsului la administrarea anticoagulantelor orale face deseori dificilă conducerea tratamentului anticoagulant, uneori în situații patologice în care menținerea unei hipocoagulabilități în limite foarte precise poate fi vitală. Conform unei sinteze recente [1] incidența anuală a hemoragiilor majore (hemoragii pentru care s-a putut documenta o pierdere de cel puțin două unități de sânge sau care au dus la spitalizare) este de 6.8% la pacienții anticoagulați *à la long* iar rata letalității anuale ca efect secundar al acestui tratament de 0.88% (tabelul 1). Urmărirea tratamentului în “clinici de anticoagulare” specializate ar reduce aceste accidente la 2.7% pe an și respectiv la 0.4% pe an (tabelul 1).

Tratament obișnuit				
Studiu	N	N × ani	majore	fatale
Landefeld 1989 [2]	565	876	7.4	1.10
Gitter & al 1995 [3]	261	221	8.1	0.45
Beyth & al 1998 [4]	264	440	5.0	0.68
<b>TOTAL</b>	<b>1090</b>	<b>1537</b>	<b>6.8</b>	<b>0.88</b>

Tratament în clinici de anticoagulare				
Studiu	N	N × ani	majore	fatale
Fosfar & al 1982 [5]	541	1.362	4.2	0.14
Fihn & al 1993 [6]	928	1.950	1.7	0.20
v d Meer & al 1993 [7]	6.814	6.085	3.3	0.64
Cannegieter & al 1995 [8]	1.608	6.475	2.5	0.33
Palareti & al 1996 [9]	2.745	2.011	1.4	0.24
<b>TOTAL</b>	<b>12.636</b>	<b>17.883</b>	<b>2.7</b>	<b>0.40</b>

Tabela 1: Rata anuală a complicațiilor majore și a celor fatale sub tratament anticoagulant

În mare măsură, aceste complicații sunt consecința dificultății menținerii stării de hipocoagulabilitate în limite terapeutice. În ansamblu, în studiile citate în tabelul 2, nu s-a reușit încadrarea între aceste limite decât pentru aproximativ 60% din timp.

Eșecul menținerii unei hipocoagulabilități adecvate este în parte atribuit interacțiunilor medicamentoase, variabilității aportului alimentar de vitamine K, dificultăților de cuantificare a răspunsului terapeutic și problemelor de complianță la tratament.

Studiu	% din timp corect dozat	% din timp supradozat	% din timp subdozat
Holm 1999 [10]	63	8	29
Beyth 1997 [11]	33	16	51
Sawicki 1999 [12]	34	16	50
Palaretti 1996 [9]	68	6	26
Cannegeister 1995 [8]	61	8	31
Hellemons 1999 [13]	48	24	28
AFASAK 1989 [14]	73	1	26
BAATAF 1990 [15]	83	9	8
SPAF III 1996 [16]	61	14	25
SPINAF 1992 [17]	56	15	29
CAFA 1991 [18]	44	16	40
AFASAK II 1999 [19]	73	9	18
EAFI 1993 [20]	59	9	32
<b>MEDIE</b>	<b>58</b>	<b>12</b>	<b>30</b>

Tabela 2: Calitatea curentă a controlului tratamentului anticoagulant cronic

O serie de măsuri, cu caracter mai degrabă organizatoric, cum ar fi: urmărirea pacienților în clinici speciale de anticoagulare; utilizarea unor aparate pentru determinarea INR-ului la domiciliu și autoajustarea tratamentului; utilizarea unor programe de calculator pentru predicția dozelor terapeutice, au dus în unele cazuri la reduceri cuantificabile ale incidenței hemoragiilor majore și letalității, dar în ansamblu aceste reduceri nu pot fi considerate suficiente.

În paralel, un număr mare de studii, in vivo și in vitro, încearcă să clarifice cantitativ farmacocinetica și farmacodinamica anticoagulantelor orale. Integrarea rezultatelor acestor studii într-o reprezentare cantitativă detaliată se poate realiza prin simularea computerizată a proceselor de absorbție, distribuție și eliminare a substanțelor implicate și a fenomenelor farmacodinamice.

Lucrarea de față prezintă o versiune a unui astfel de simulator, realizat de unul dintre autori (ADC) și interpretarea unor scenarii tipice. Simulatorul se numește "Warfarissimo" și se prezintă pentru utilizatori sub forma unui sit WWW care poate fi accesat public la adresa <http://warfarissimo.corlan.net> folosind orice browser.

## 2 Metode

Prin "model farmacologic" înțelegem descrierea, detaliată cantitativ, a unei concepții privind farmacocinetica și farmacodinamica unor

medicamente, în cazul de față al warfarinei și acenocumarolului. Simulatorul este o reprezentare computerizată a acestei descrieri.

Modelul farmacologic folosit de noi a fost construit pe baza unor studii din literatură, enumerate mai jos. Majoritatea studiilor publicate privesc warfarina, care este anticoagulantul cel mai folosit în lumea anglosaxonă. Am studiat și acenocumarolul întrucât la noi, și în alte țări, este preferat warfarinei.

### 2.1 Modelul farmacologic

#### 2.1.1 Absorbție și distribuție

Am folosit un model cu două compartimente: unul reprezentând tractul digestiv și celălalt spațiul de distribuție al preparatului cumarinic. La momentul administrării se presupune că substanța se distribuie instantaneu și uniform în primul compartiment de unde nu este eliminată decât prin trecerea în al doilea compartiment cu o viteză proporțională cu concentrația din primul, cu un timp de înjumătățire de 30'.

Acest model corespunde absorbției rapide și complete a preparatelor cumarinice și faptului că substanța circulantă este imediat legată de proteinele plasmatică [21] într-o proporție de peste 99% astfel încât nu se ajunge la un echilibru între concentrația plasmatică și cea din lumenul intestinal.

Versiunea actuală a simulatorului nu include interacțiuni cum ar fi legarea warfarinei de proteinele alimentare [22]. Administrarea intravenoasă a warfarinei poate fi simulată prin distribuția instantanee în compartimentul al doilea.

Am considerat că fiecare doză administrată este un amestec racemic în cantități egale de enantiomeri S și R ai substanței administrate.

Spațiul de distribuție în compartimentul plasmatic a fost fixat, în modelul nostru, la 140ml/kgC pentru warfarina S și R (după [23]) și de 220ml/kgC și respectiv 400ml/kgC pentru R-acenocumarol și respectiv S-acenocumarol[24].

#### 2.1.2 Eliminare

În modelul nostru am considerat că formele S și R ale warfarinei și acenocumarolului sunt în totalitate eliminate (prin hidroxilare) în microzomii hepatice de varietăți ale citocromului P-450, într-un mod diferit pentru fiecare enantiomer al fiecărei substanțe.

Dintre varietățile de citocrom P450, CYP2C9 realizează cea mai mare parte a eliminării formelor S, și contribuie în proporție de circa 40% la eliminarea R-acenocumarolului. Ceilalți citocromi implicați sunt CYP2C19, CYP2A1 și CYP3A4.

Citocromul CYP2C9, care este implicat și în eliminarea altor medicamente cum ar fi fenitoina, tolbutamida, diclofenacul și losartanul, a fost studiat extensiv pentru că gena care îl codifică prezintă o serie

de mutații cu prevalență mare care scad substanțial activitatea biologică a citocromilor [25]. Sunt cunoscute 6 alele, dintre care pentru populațiile cauziene sunt relevante: CYP2C9\*1 (forma sălbatică), CYP2C9\*2 (substituția argininei din poziția 144 cu cisteină) și CYP2C9\*3 (substituția izoleucinei din poziția 359 cu leucină). Aceste trei gene se pot combina în 6 genotipuri: \*1\*1, \*1\*2, \*1\*3, \*2\*2, \*2\*3 și \*3\*3. Prevalența lor în populația cauziană este ilustrată în figura 1.

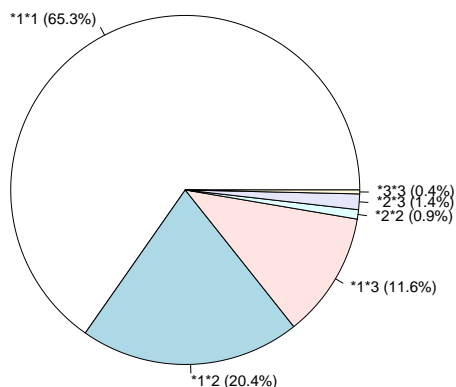


Figura 1: Prevalența genotipurilor CYP2C9 în populația cauziană

Conform cu [25, 26, 27] contribuția relativă a diversilor citocromi la hidroxilarea enantiomerilor warfarinei și acenocumarolului poate fi aproximată prin valorile din tabelul 3 pentru genotipul CYP2C9\*1\*1, valori pe care le-am utilizat în modelul nostru. Clearance-ul *in vitro* al S-warfarinei prin citocromii citocromilor CYP2C9\*2 și CYP2C9\*3 este de 42–69% și respectiv 4–8% din cel produs de CYP2C9\*1[25]. Aceste raporturi sunt diferite în funcție de substrat și în funcție de specia la care s-a transferat alela respectivă (de obicei la un miceliu sau o bacterie).

Activitatea *in vivo* nu poate fi inferată direct din cea *in vitro* care nu este determinată pe celule umane iar expresia celor două gene la indivizii heterozigoți poate fi variabilă și nu este cunoscută. În schimb, o serie de studii cu warfarină [28, 29, 30] raportează dozele medii de întreținere cu amestecul racemic pentru diverse genotipuri, valori care sunt mai bine caracterizate (pe mai multe cazuri) pentru genotipurile \*1\*1, \*1\*2 și \*1\*3. Am identificat un singur studiu [26] care raportează dozele de întreținere pentru acenocumarol în funcție de genotip (tabelul 4). Relația cantitativă

Citocrom	Contribuție la eliminare (%)			
	Warfarină		Acenocumarol	
	R	S	R	S
CYP2C9	5	97	40	99
CYP2C19	70	1	45	1
CYP1A2	23	1	15	0
CYP3A4	2	1	0	0

Tabela 3: Contribuția varietăților de citocrom P450 la catabolismul warfarinei și acenocumarolului la indivizii cu genotip CYP2C9\*1\*1

dintre activitatea CYP2C9 și dozele de întreținere este neliniară dar este de presupus că este monotonă în sensul că unei doze de întreținere mai mici îi corespunde o activitate a citocromului mai redusă. Desemnând valoarea de 1.0 pentru activitatea CYP2C9 a homozigoților cu gena sălbatică (\*1\*1), am determinat prin căutare (simulare cu diverse valori ale activității enzimei până la obținerea comportamentului corespunzător celui experimental) valorile medii de 0.7 și 0.4 pentru genotipurile \*1\*2 și \*1\*3.

Substanță:	Genotip		
	*1*1	*1*2	*1*3
mg Warfarină [25], INR=2.5:	5.28	4.59	3.78
mg Acenocumarol [26], INR=2.5:	2.44	2.06	1.57
Activitate CYP2C9 (simulat)	1.00	0.70	0.40
mg Warfarină INR=3.0 (simulat)	6.10	5.25	4.30
mg Warfarină INR=3.5 (simulat)	6.80	5.90	4.85
mg Acenocumarol INR=3.0 (simulat)	2.95	2.46	1.85
mg Acenocumarol INR=3.5 (simulat)	3.40	2.82	2.11

Tabela 4: Dozele de întreținere medii pentru acenocumarol racemic și warfarină racemică în funcție de genotip determinate experimental (primele două rânduri); valorile determinate prin căutare pentru activitatea CYP2C9 și dozele determinate prin căutare pentru anticoagulare înaltă la aceleași genotipuri.

### 2.1.3 Efectul asupra sintezei proteinelor plasmatiche vitamin-K dependente

Factorii de coagulare II, VII, IX și X și proteinele anticoagulante S și C sunt sintetizate din precursori proteici existenți în ficat prin  $\gamma$ -carboxilarea mai multor resturi de glutamat din structura lor[23] (figura 2). Reacția este esențială pentru prezența activității biologice a acestor proteine (deși asupra mecanismului exact sunt emise ipoteze aparent contradictorii).

$\gamma$ -Carboxilarea factorilor de coagulare are loc simultan cu oxidarea dihidro-vitaminei-K<sub>1</sub> la vitamin-K<sub>1</sub>-2,3-epoxid. Reducerea din această formă înapoi la vitamină-K<sub>1</sub> se face de către o enzimă cu structură necunoscută, sensibilă la warfarină, numită

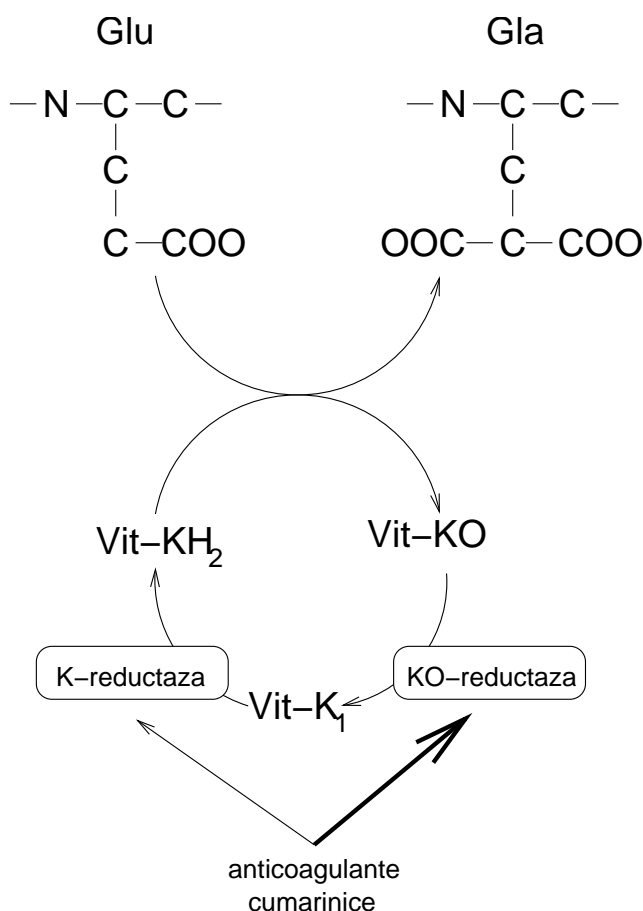


Figura 2: Mecanismul de acțiune al antivitaminelor K

vitamin- $\text{K}_1$ -2,3-epoxid-reductază (VKOR). La rândul ei, vitamina- $\text{K}_1$  este redusă la vitamin- $\text{K}_1\text{H}_2$  sub acțiunea unei alte enzime, vitamin- $\text{K}_1$ -reductaza, mai puțin sensibilă la efectul warfarinei. Un proces similar suferă probabil și celelalte vitamine K.

Un studiu din 1997 [31] descrie două enzime în reticulul endoplasmatic: o vitamin- $\text{K}_1$ -reductază care nu poate fi blocată de warfarină și un complex enzimatic care este inhibat de warfarină și care îndeplinește atât funcția VKOR cât și funcția de vitamin- $\text{K}_1$ -reductază. Acest complex enzimatic pare a fi format dintr-o glutation-S-transferază (GST) care, după ce este asamblată cu o altă proteină, pierde proprietatea enzimatică inițială și dobândește activitatea VKOR. Atât GST cât și VKOR sunt sensibile la warfarină.

Warfarina inhibă ireversibil VKOR [32] de unde rezultă că *turnover*-ul enzimei joacă un rol foarte important în cinetica reacțiilor redox ale vitaminei-K și deci în rata de producție a factorilor de coagulare, dar valoarea acestui *turnover* nu este cunoscută.

Concentrațiile plasmatice și timpii de înjumătățire ai factorilor de coagulare vitamin-K dependenți sunt prezentate în tabelul 5 [23, 33].

Concentrația și activitatea factorilor circulanți fiind considerate constante în timp, la subiectul sănătos,

Proteina	T1/2 (ore)[23]	nmol/L [33]
Factor VII	6	10
Factor IX	24	90
Factor X	36	170
Factor II	50	1400
Proteina C	8	60
Proteina S	30	300

Tabela 5: Concentrațiile plasmatice medii și timpii de înjumătățire ai proteinelor plasmatice vitamin-K dependente

rata de producție și de eliminare a fiecăruia sunt egale.

O descriere cantitativă, determinată experimental, a efectului warfarinei asupra variației în timp a activității factorilor II, X și VII (care sunt relevanți pentru valoarea INR) se găsește în [34]. Tratamentul cu warfarină a fost instituit și menținut timp de 8 zile la 9 voluntari sănătoși, INR fiind adus în jur de valoarea de 2.5. În perioada tratamentului de întreținere, activitatea factorilor VII și X scade la aproximativ 12% din valoarea normală în vreme ce activitatea factorului II scade la aproximativ 30%. Aceste date furnizează un sistem de ecuații supradeterminat prin rezolvarea căruia am obținut coeficienții unei funcții hiperbolice care descrie relația cantitativă între activitatea factorilor de coagulare și INR.

În modelul nostru am ales o valoare arbitrară pentru timpul de înjumătățire al VKOR. Sinteza și degradarea acestei enzime au fost reprezentate printr-o cinetică de ordinul I, fiind egale la subiectul netratat. Efectul warfarinei și acenocumarolului asupra VKOR au fost implementate ca o reacție ireversibilă cu o viteză de reacție proporțională cu cantitatea de VKOR și cea de anticoagulant circulant și cu câte o constantă de reacție proprie fiecărui enantiomer.

Concentrația de vitamină K circulantă a fost desemnată ca având un nivel fiziologic de 1.0, și nu poate fi modificată de la un scenariu la altul în această versiune. Ciclul redox al vitaminei K (figura 2) a fost implementat prin modelele cinetice a trei reacții ireversibile (două reduceri și o oxidare), viteza de reacție a oxidării determinând (prin-un coeficient de proporționalitate) viteza de producere a factorilor de coagulare  $\gamma$ -carboxilați. Concentrația precursorilor factorilor disponibili pentru reacție a fost considerată constantă, astfel încât viteza reacțiilor de  $\gamma$ -carboxilare în modelul nostru este determinată doar de concentrația de vitamină  $\text{K}_1\text{H}_2$  disponibilă pentru reacție—care este determinată la rândul său de activitatea VKOR.

## 2.2 Implementarea simulatorului

Simulatorul “Warfarissimo” funcționează pe principiul metodei cu diferențe finite, cu pas fix, pentru

rezolvarea sistemelor de ecuații diferențiale liniare de ordinul I. Timpul este discretizat în intervale finite și egale, numite “pași de simulare”, în cazul nostru intervale de 7.2 secunde. Procesele care ne interesează, de absorbție, distribuție, variație a concentrației factorilor de coagulare și a INR-ului, luate pe ansamblul organismului, pot fi considerate aproape statice (cvasistatice) la această scală de timp. De exemplu, ținând cont că timpul de înjumătățire al R-warfarinei plasmatică este de cca 40 de ore, putem considera că într-un interval de 7.2 secunde scăderea warfarinemiei este liniară iar viteza de eliminare este constantă. Viteza de eliminare este dată de produsul între clearance-ul substanței și concentrația sa la începutul intervalului considerat.

Simulatorul stochează în memoria calculatorului, pentru fiecare substanță luată în considerare și pentru fiecare pas de simulare, concentrația plasmatică a substanței într-o celulă de memorie. Apoi, la fiecare pas de simulare, calculează vitezele de variație pentru fiecare substanță în parte, în funcție de relațiile descrise anterior. De exemplu, pentru factorul II, variația este diferența dintre cantitatea produsă și cea eliminată. Cea eliminată este dată de produsul dintre concentrația plasmatică și clearance-ul factorului II (corespunzător timpului de înjumătățire de 50 de ore). Cea produsă este egală cu cea eliminată dacă vitamina- $K_1H_2$  este la nivel normal sau scăzută la proporția față de normal a nivelului acesteia.

Pe lângă aceste procese simulatorul mai ia în considerare evenimente introduse de utilizator, cum ar fi de exemplu administrarea unei cantități de acenocumarol racemic (din care câte jumătate este adunată la cantitatea de S-acenocumarol și respectiv R-acenocumarol din compartimentul digestiv în momentul administrării).

Datele de intrare pot fi introduse accesând sit-ul [warfarissimo.corlan.net](http://warfarissimo.corlan.net). În fereastra browser-ului apare un formular similar celui din figura 3. În câmpurile acestui formular se pot introduce medicamentele administrate, momentele administrării și dozele, precum și parametri generali ai cazului studiat cum ar fi greutatea corporală sau tipul genetic de citocrom CYP2C9, după care se apasă butonul ‘Simulate’.

Simularea se desfășoară în modul descris mai sus și durează în jur de 15 secunde. Timpul de răspuns al sistemului poate fi mai lung dacă alți utilizatori, de oriunde din rețeaua Internet, lansează în același timp alte simulări. Rezultatele sunt prezentate în formă grafică. Un set de date care determină complet un set de rezultate poartă numele de “scenariu de simulare”.

Rezultatele unui scenariu, în care s-a administrat o doză de întreținere de 5.28mg de warfarină zilnic unui subiect de 70kg, cu genotip \*1\*1, sunt prezentate în figura 4.

Toate graficele au timpul pe axa  $x$  unde sunt reprezentate 20 de zile, fiecare interval între două

trasee verticale reprezentând 24 de ore. Primul grafic reprezintă evoluția în timp a concentrației plasmatică a S-warfarinei (graficul cu linie punctată) și R-warfarinei (graficul cu linie aproape continuă).

Al doilea grafic prezintă evoluția în timp a INR-ului. În exemplu se observă că un INR de 2.0 a fost atins în 5 zile (prima administrare în acest scenariu are loc la ora 0 a zilei 1) și INR-ul s-a stabilizat în jurul valorii de 2.6.

Al treilea grafic reprezintă variația în timp a factorilor de coagulare. Liniile continue reprezintă concentrațiile plasmatică totale ale factorilor VII, IX, X și XII (în ordinea descrescătoare a vitezei de scădere după inițierea tratamentului). Liniile întrerupte reprezintă concentrațiile factorilor circulanți sub- $\gamma$ -carboxilați, care nu sunt activi biologic. Diferența între aceste grafice, în fiecare moment, corespunde nivelului de activitate al factorului respectiv, reprezentat ca o fracție din activitatea normală notată cu 1.0.

Ultimul grafic este analog cu cel de al treilea, dar descrie activitatea plasmatică a proteinelor anticoagulante C și S.

## 2.3 Calibrarea simulatorului

Pe lângă parametrii care pot fi modificați de utilizator (activitatea CYP2C9 și greutatea corporală, în versiunea curentă) simulatorul mai include și “parametri interni” ale căror valori sunt fixate și nu pot fi modificate de utilizator.

Calibrarea simulatorului constă în determinarea prin încercări (simulări) succesive a valorilor parametrilor interni care asigură reproducerea satisfăcătoare a datelor experimentale. Parametrii interni sunt în general constante de reacție. Această metodă, numită “căutare”, este echivalentă cu rezolvarea unor sisteme de ecuații ale căror necunoscute sunt parametri interni, ale căror constante sunt valorile determinate experimental și raportate în literatură, și ale căror forme sunt determinate de sistemul de ecuații diferențiale care constituie modelul nostru și care descriu cinetica reacțiilor chimice sau fenomenelor de difuzie menționate în secțiunile anterioare.

**Homeostazia factorilor de coagulare vitamin-K dependenți.** Prima fază a calibrării a constat în ajustarea: afinității vitamin- $K_1$ -2,3-epoxidului pentru VKOR (constanta de reacție a primei reduceri); afinității vitaminei  $K_1$  pentru vitamin  $K_1$  reductază; afinității vitamin  $K_1H_2$  pentru  $\gamma$ -carboxilază; clearance-ului și aportului de vitamină  $K_1$ ; a coeficientului de proporționalitate între consumul de vitamină  $K_1H_2$  și cantitatea de factori  $\gamma$ -carboxilați; activității și afinității vitamin-K-reductazei independente de warfarină. Acești parametri au fost ajustați în așa fel încât homeostazia factorilor de coagulare să fie constantă și stabilă (în cazul în care se

The screenshot shows a web browser window with the following content:

File Edit View Go Communicator Help

Back Forward Reload Home Search Netscape Print Security Shop Stop

Bookmarks Location: http://warfarissimo.corlan.net:20202/sim1631838261 What's Related

Humor Linux Debian

Patient weight (kg): 90 P450-CYP2C9 activity 0.650

Day	Hour	Min	Dose	Day	Hour	Min	Dose	Day	Hour	Min	Dose
1	0	0	5.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
2	0	0	5.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
3	0	0	2.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
4	0	0	2.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
5	0	0	2.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
6	0	0	2.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
7	0	0	2.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
8	0	0	0.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
9	0	0	0.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000
10	0	0	0.000	0	0	0	0.000	0	0	0	0.000

Simulate!

Figura 3: Formularul de introducere a datelor pentru un scenariu de simulare

schimbă artificial concentrația unuia din substratele implicate, de exemplu concentrația de vitamină K circulantă se forțează la 0, concentrațiile tuturor substanțelor să revină la normal prin efectul reacțiilor respective).

**Efectul warfarinei asupra factorilor de coagulare circulanți.** Odată reprodusă homeostazia factorilor de coagulare, am ajustat afinitatea warfarinei S și R (la 0.2 din cea a warfarinei S) pentru VKOR și rata de înjumătățire a VKOR astfel încât, pentru un individ de 70kg, cu o activitate a CYP2C9 de 1.0, cu un timp de înjumătățire mediu corespunzător valorilor din literatură [23] să se obțină concentrația plasmatică medie din [23], iar la administrarea regimului din [34] la voluntari sănătoși, evoluția în timp a activității factorilor de coagulare II, VII și X să reproducă rezultatele din [34]. Valorile INR-ului din același experiment au fost reproduse în virtutea relației anterior determinate între factorii de coagulare și INR.

**Efectul acenocumarolului.** În următoarea fază am ajustat afinitatea enantiomerilor de acenocumarol pentru VKOR astfel încât pentru cazul \*1\*1 să se obțină un INR de 2.5 cu doza medie administrată în [26].

## 3 Rezultate

### 3.1 Rezultatele calibrării

Figura 5 prezintă, cu linie continuă, graficul valorilor medii ale factorilor de coagulare și a INR-ului determinate experimental în [34], și cu linie întreruptă graficul valorilor aceluiași variabile într-un scenariu de simulare în care s-a administrat unui subiect teoretic de 70kg cu genotip \*1\*1 warfarină racemică în același regim (trei zile câte 10mg urmate de 5 zile câte 5mg) ca în studiul din [34].

Media pătratică a diferențelor între valorile măsurate și cele simulate pe toată durata experimentului a fost de 0.056 pentru factorul VII, 0.066 pentru factorul II, 0.075 pentru factorul X și 0.15 pentru INR.

### 3.2 Valorile medii ale activității CYP2C9.

Valorile medii ale activității CYP2C9 pentru tipurile \*1\*2 și \*1\*3 au fost determinate în astfel încât, pentru un subiect sănătos de 70kg, dozele de menținere a INR la valoarea de 2.5 să fie mediile celor raportate în literatură și menționate în tabela 4. Rezultatele pentru aceste medii au fost de 0.7 pentru \*1\*2 și 0.4 pentru \*1\*3.

Pentru aceste valori am căutat apoi dozele de întreținere care ar fi necesare pentru atingerea unui INR de 3.0 sau de 3.5. Aceste rezultate se găsesc tot în tabela 4.

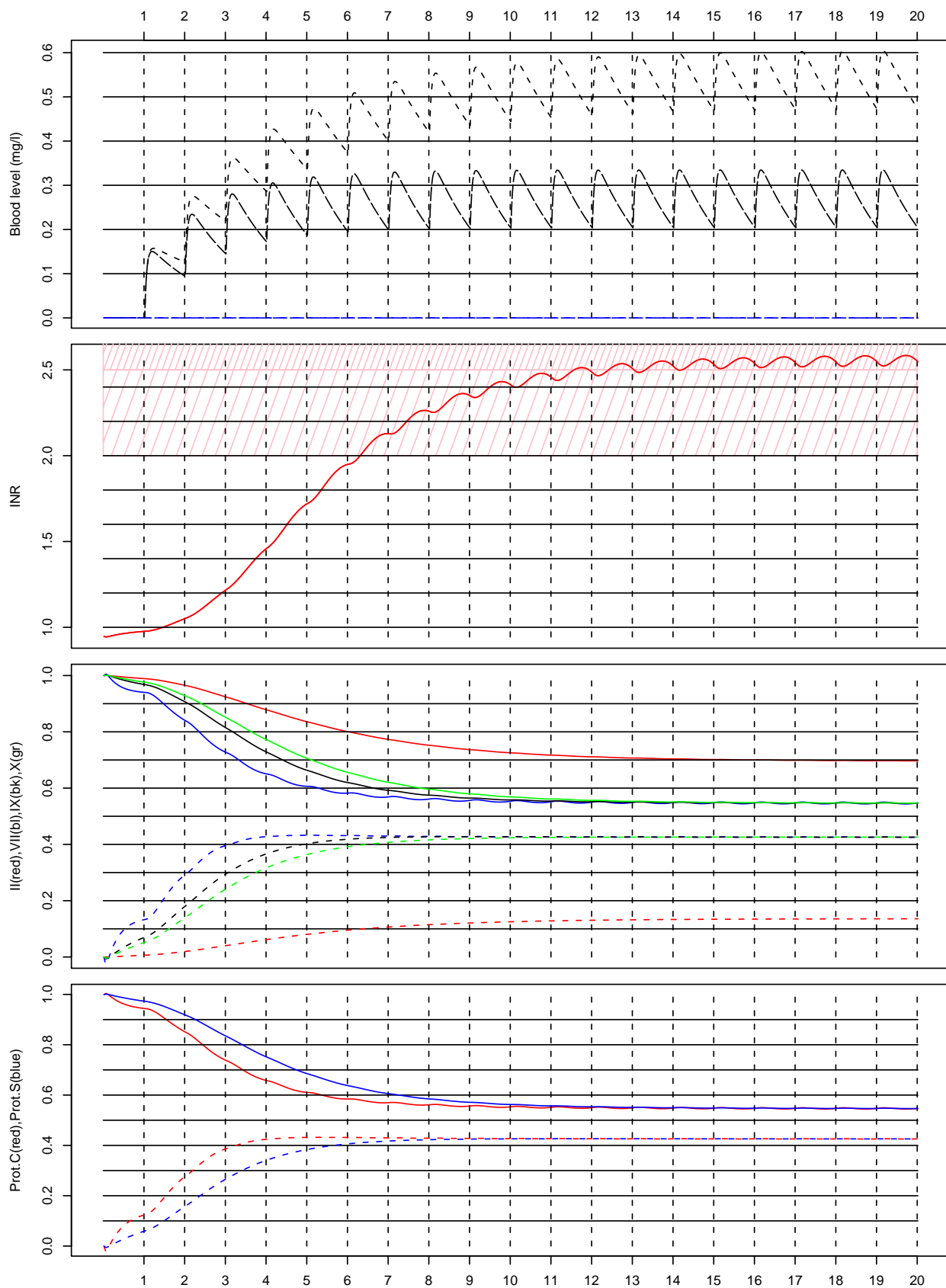


Figura 4: Prezentarea grafică a rezultatelor unui scenariu

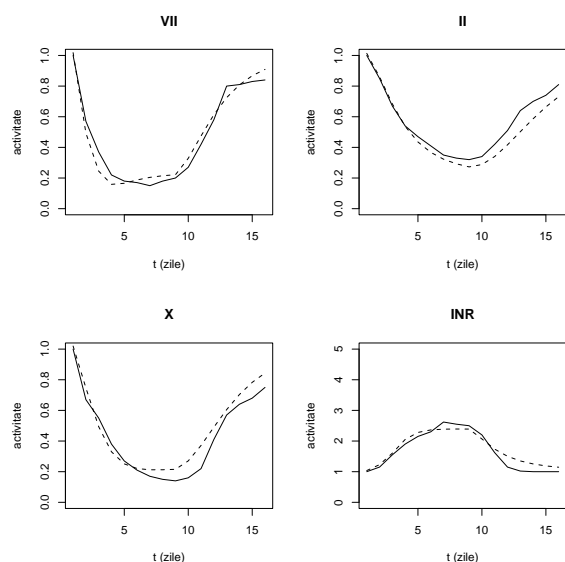


Figura 5: Evoluția în timp a activității factorilor de anticoagulare II, VII și X și a INR-ului în administrarea experimentală a warfarinei la voluntari sănătoși (linii continue, [34]) și reproducerea aceluiași experiment prin simulare (linii punctate)

### 3.3 Variabilitatea interindividuală a activității CYP2C9

Este posibil să existe o variabilitate interindividuală importantă a activității *in vivo* a CYP2C9 la același genotip. De exemplu, Thijssen [24] a studiat un pacient tânăr cu genotipul \*1\*3 la care doza de întreținere a fost de 0.7mg acenocumarol pe zi, aproximativ de trei ori mai mică decât media raportată pentru un eșantion de 48 de subiecți cu genotipul \*1\*3 tratați cu acenocumarol și raportați în [26]. Doza de întreținere a prezentat însă variații între 0.32 și 3.14 mg/zi. O doză de întreținere de cca 0.5mg/zi pentru INR 2.5 a fost menționată în [35] pentru două cazuri de tip \*3\*3.

În studiul [24] la pacientul cu genotipul \*1\*3, de 62kg, după întreruperea tratamentului (postoperator) cu doza de întreținere de 0.5mg s-a efectuat identificarea genotipului și s-au administrat 8mg acenocumarol în priză unică, după care s-au dozat concentrațiile sanguine de acenocumarol R și S, seriat, de 7 ori în cursul a 24 de ore. Un alt subiect sănătos, de 78kg, cu genotipul \*1\*1 a urmat același protocol.

Am încercat să reproducem cu “Warfarissimo” rezultatele acestui experiment la un subiect de tip \*1\*1, de 78kg obținând evoluția concentrațiilor sanguine de R/S-acenocumarol din figura 6 stânga, iar pentru un subiect cu greutatea de 61 de kg și activitate CYP2C9 de 0.1, cea din figura 6 dreapta. Aceste grafice sunt aproape identice cu cele din [24] figura 2, care reprezintă concentrațiile respective măsurate.

În continuare, într-un alt scenariu, am fixat

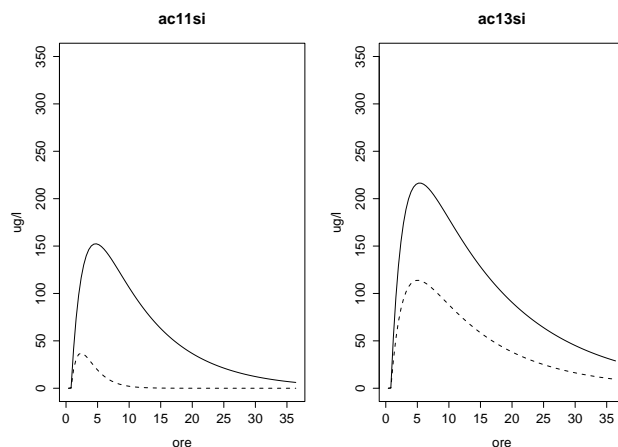


Figura 6: Variația concentrațiilor plasmatice ale R-acenocumarolului (linie continuă) și S-acenocumarolului (linie punctată) după administrarea unei singure doze de 8mg într-un scenariu cu greutatea corporală de 78kg și activitate normală a CYP2C9 (stânga) și într-un scenariu cu greutatea corporală de 61kg și activitate a CYP2C9 redusă la 0.1 (reproducerea prin simulare e experimentului din [24])

greutatea corporală la 61kg și activitatea CYP2C9 la 0.1 și am simulat administrarea de acenocumarol după schema descrisă în [24] pentru pacientul \*1\*3, adică de 5mg pe săptămână cu schema 1-1-1-0-1-1-0, obținând un INR cuprins în general între 2 și 3, corespunzător rezultatului experimental.

În aceste scenarii a fost nevoie să folosim o activitate a CYP2C9 de 0.1 față de media de 0.4 pentru acest genotip ceea ce pare să indice că, în cadrul genotipului \*1\*3, posibil datorită expresiei variabile a celor două alele, activitatea CYP2C9 poate varia cu până la 300%.

### 3.4 Evoluția concentrațiilor sanguine de anticoagulant

O metodă indirectă propusă în literatură pentru determinarea tipului genetic de CYP2C9 a fost determinarea raportului între concentrația plasmatică de R și S acenocumarol. Figura 7 prezintă aceste niveluri plasmatice la administrarea dozelor medii de întreținere în scenarii cu greutatea corporală de 70kg și cu activitate a CYP2C9 medie pentru cele trei genotipuri studiate (1.0, 0.7 și 0.4). Se observă că evoluția în timp a concentrației formelor S este similară în cele trei cazuri, dar cea a formelor R variază în funcție de doză. Aceasta se explică prin activitatea mult mai ridicată de inhibiție a VKOR de către forma S, al cărei nivel plasmatic în ultimele 24–48 de ore este principalul determinant al INR-ului, astfel încât atingerea unui INR dat cu un medicament dat presupune în primul rând obținerea concentrației



plasmatică corespunzătoare a formei S. Totuși, forma S de acenocumarol persistă în sânge doar pentru scurt timp după fiecare administrare, astfel încât pare improbabil ca raportul între concentrația formei R și cea a formei S să aibă valori cu utilitate practică pentru acenocumarol.

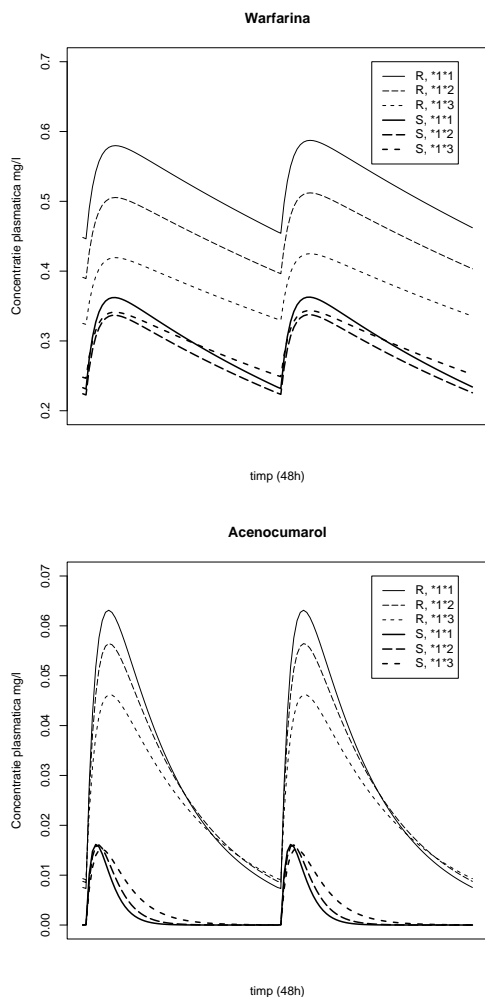


Figura 7: Variația concentrațiilor plasmatice ale formelor S- și R- de warfarină și acenocumarol pe o durată de două zile în perioada de întreținere în scenariile de calibrare pentru INR=2.5 în funcție de genotip

Pentru warfarină acest raport a variat între 1.72–2.24 pentru genotipul \*1\*1, între 1.5–1.79 pentru genotipul \*1\*2 și între 1.23–1.33 pentru genotipul \*1\*3 astfel încât ar putea fi folosit pentru identificarea genotipului.

### 3.5 Efectul regimului de încărcare în funcție de genotip

În figura 8 este ilustrată evoluția INR în trei scenarii în care greutatea corporală a fost de 70kg și s-au administrat câte 4mg acenocumarol pe zi vreme de trei

zile consecutiv. Valoarea maximă a INR a fost atinsă în același moment, la 16 ore de la ultima administrare, și a fost de 2.4 pentru tipul \*1\*1 (CYP2C9=1.0), de 2.8 pentru tipul \*1\*2 (CYP2C9=0.7) și de 3.4 pentru \*1\*3 (CYP2C9=0.4). O variație a INR chiar mai mare a fost produsă însă prin varierea greutății corporale (fig 8 jos) doar între 50 și 100kg, la o valoarea normală a CYP2C9 (1.0 corespunzător \*1\*1).

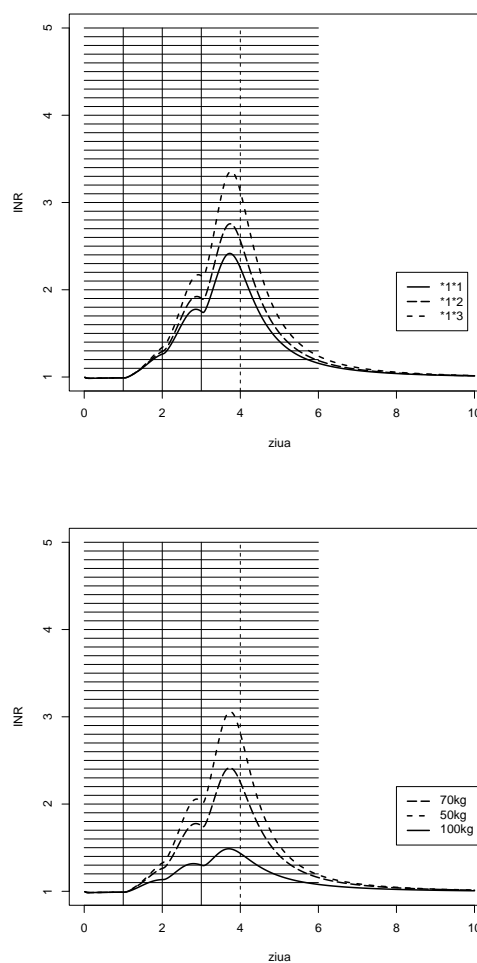


Figura 8: Efectul a trei prize zilnice “de încărcare” a câte 4mg de acenocumarol asupra INR-ului în trei scenarii cu aceeași greutate corporală (70kg) și genotipuri \*1\*1, \*1\*2 și \*1\*3 (sus) și respectiv același genotip (\*1\*1) și greutate corporală de 50, 70 și 100kg (jos)

### 3.6 Efectul schemelor de tratament cu multipli de 1mg de acenocumarol

Am studiat efectul unor scheme de anticoagulare orală obișnuite asupra evoluției INR. Întrucât o tabletă de Sintrom are 4mg, acesta se poate administra numai în multipli de 1mg (un sfert de tabletă).

În figura 9, graficul de sus, este prezentată evoluția

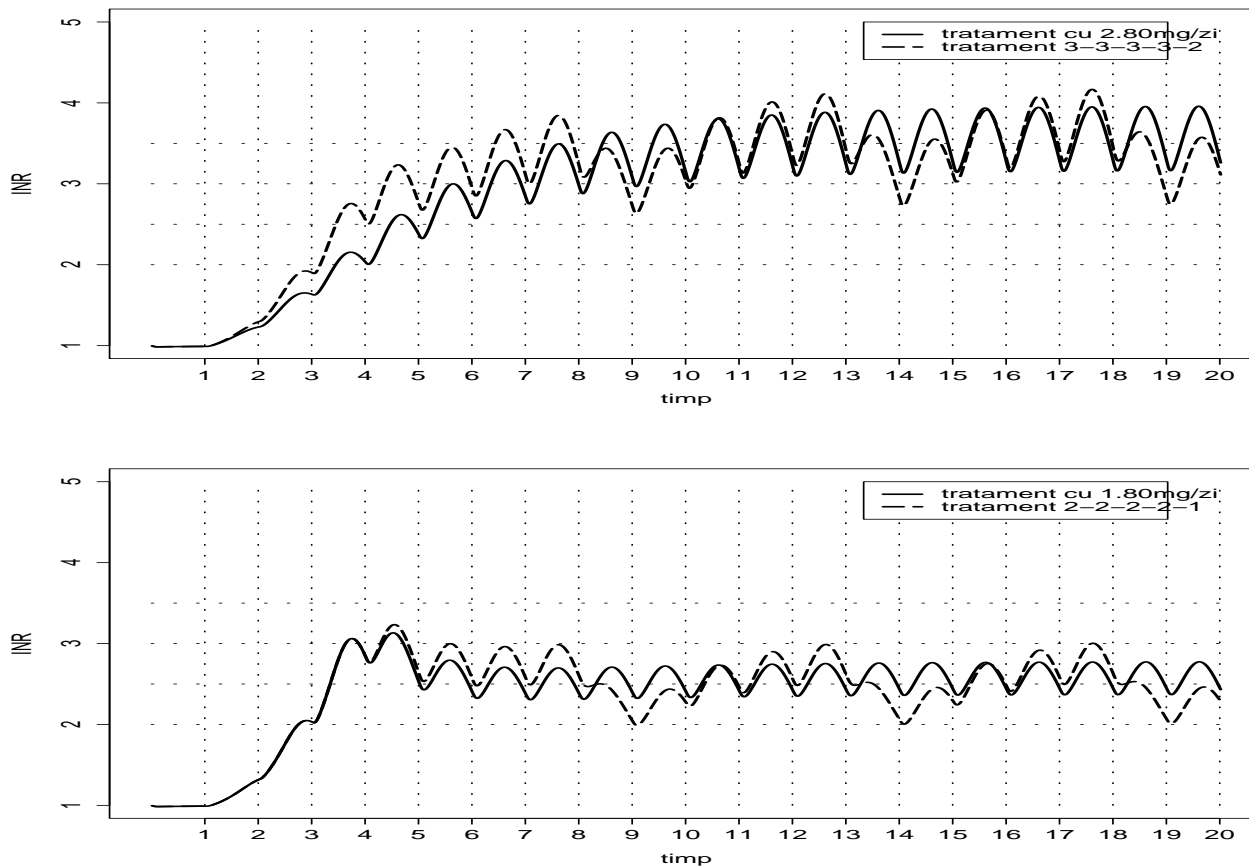


Figura 9: Diferențe între administrarea unei doze exacte și unui regim cu doze în număr întreg de mg la un nivel de anticoagulare de INR=3.5 (sus) și respectiv INR=2.5 (jos)

în timp a INR simulat două scenarii cu genotip \*1\*2 și greutate corporală de 70kg la care ținta terapeutică a fost INR=3.5. Doza optimă este de 2.8 mg. Într-unul din scenarii s-au administrat chiar 2.8mg (ceea ce nu se poate face într-un caz real) iar în celălalt s-a administrat după schema 3-3-3-3-2. Se observă că în primul caz (linia continuă) variația INR a fost între 3.2-3.8 iar în al doilea caz (linia întreruptă) a fost între 2.7-4.2. Cu alte cuvinte, intervalul de variație al INR aproape s-a triplat prin folosirea schemei 3-3-3-3-2 în locul unei doze zilnice exacte.

Similar, în figura 9 jos ținta a fost INR=2.5 care în condițiile unui genotip \*1\*3 cu o greutate corporală de 80kg presupune o doză zilnică de 1.8mg. Administrarea dozei exacte a produs oscilații ale INR cu amplitudinea de 0.4 în vreme ce administrarea după schema 2-2-2-2-1 a produs oscilații cu amplitudinea de 1.0.

### 3.7 Efectul administrării neregulate

În figura 11 se prezintă cu linie continuă grosă tratamentul de încărcare și întreținere cu o schemă 2-1 de acenocumarol într-un scenariu cu genotipul \*1\*3 și

greutatea de 70kg. Ca și în exemplele prezentate anterior, s-a administrat o singură doză la aceeași oră (convențional ora 0) în fiecare zi. În două variante ale acestui scenariu (cu linii întrerupte) s-a întârziat o doză cu 12 și respectiv 24 de ore și într-o a treia variantă (cu linie continuă subțire) s-a sărit complet o doză. Întârzierea unei doze (de 2mg) cu 12 ore a produs o scădere a INR sub 2 pentru 24 de ore; întârzierea cu 24 de ore (doza luată cu doza următoare a doua zi) o scădere sub 2.0 pentru 48 de ore iar sărirea completă a unei doze a dus la scăderea INR sub 2.0 pentru peste 4 zile.

În figura 10 cu genotipul \*1\*2 și 70kg s-a urmărit atingerea unui INR de 3.5 (sus) și respectiv 2.5, scop în care s-au administrat 2.86mg și respectiv 2.06mg zilnic. Traseele continue reprezintă evoluția INR după administrarea amestecului racemic la aceeași oră în fiecare zi, iar cele cu linie întreruptă—după administrarea la un moment generat aleator cuprins între ora 6:00 și ora 22:00 în fiecare zi. Seria de momente generate aleator la care s-a făcut administrarea a fost aceeași și pentru ținta terapeutică de INR=3.5 și pentru cea de INR=2.5.

Se observă că administrarea aleatorie a produs

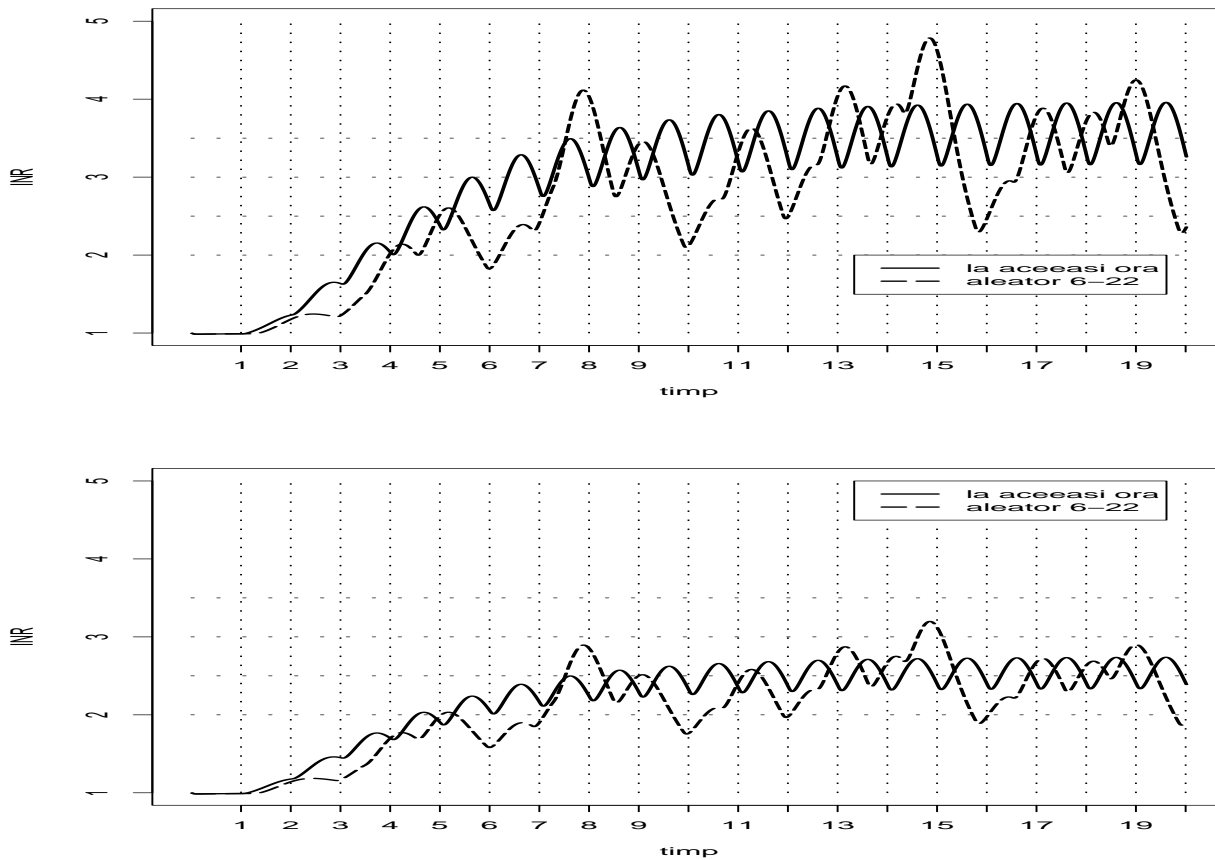


Figura 10: Diferențe între administrarea dozelor la aceeași oră în fiecare zi și administrarea la un moment ales la întâmplare între orele 6–22 în fiecare zi, la un nivel de anticoagulare de  $INR=3.5$  (sus) și respectiv  $INR=2.5$  (jos); momentele de administrare au fost generate aleator, dar aceleași momente au fost folosite în ambele scenarii.

oscilații neregulate cuprinse între 1.9 și 3 pentru scenariul cu ținta de  $INR=2.0$  și între 2 și 4.9 pentru scenariul cu ținta de  $INR=3.5$ . Oscilațiile mai ample pentru ținta de 3.5 se datorează faptului că au loc pe fondul unui nivel mai scăzut al factorilor de coagulare.

## 4 Discuții

Modelarea computerizată nu este o metodă directă de aflare a adevărului, ci doar una de clarificare cantitativă a teoriilor.

În ansamblu, lucrarea noastră susține că, din punct de vedere teoretic, un model format din ecuații care descriu cinetica unei succesiuni de reacții chimice, expuse la metode, și care este calibrat să reproducă rezultatele experimentale din bibliografie, are drept consecință logică (și cantitativă) manifestările expuse în secțiunile 3.4–3.7. Lucrarea nu demonstrează că acest model este exact (conform realității), el putând fi respins prin identificarea unor contraexemplu, fie experimental fie în literatură.

Utilitatea demersului constă în faptul că este mult

mai ușor de verificat dacă administrarea acenocumarolului după o schemă 2-2-2-2-1 față de o doză constantă zilnică duce într-adevăr la o variație mai mare a  $INR$ -ului, cum ar prezice modelul nostru, decât de monitorizat, să zicem, variațiile vitamin- $K_1$ -2,3-O în citoplasma hepatocitelor.

Rejectarea experimentală a unor predicții ale unor modele computerizate, atunci când se poate obține cu mijloace simple, permite eliminarea unor ipoteze privind mecanismele care au dus la acele predicții fără a mai fi nevoie de experimente costisitoare sau riscante.

De exemplu, într-un studiu preliminar am presupus că reacția între derivatele cumarinice și VKOR ar fi reversibilă, sau cu alte cuvinte că scăderea la zero a concentrației de acenocumarol ar fi însoțită de revenirea reacției de  $\gamma$ -carboxilare la o viteză normală. Întrucât factorul VII are un timp de înjumătățire de numai 6 ore, iar acenocumarolul, în ansamblu de numai 8 ore, modelul prezice variații diurne foarte mari ale  $INR$  (de ordinul a 1.5) dacă se administrează numai o priză pe zi, variații care puteau fi reduse administrând medicamentul fracționat, de două sau de trei ori pe zi.

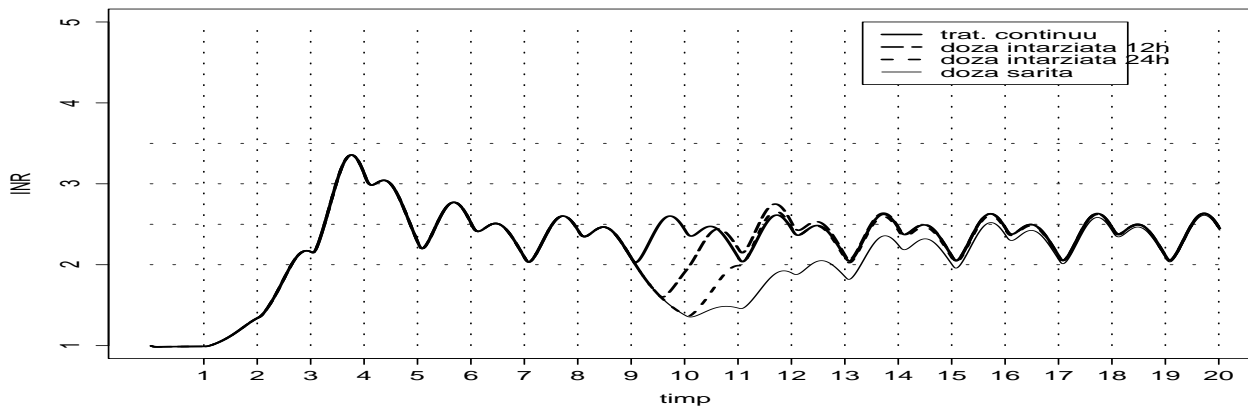


Figura 11: Efectul întârzierii sau săririi unei doze asupra INR.

Acest rezultat contravenea experienței clinice curente și am identificat un studiu simplu care demonstra inutilitatea administrării fracționate a acenocumarolului prin măsurători frecvente ale INR. Această discordanță a demonstrat că mai există un fenomen de integrare în timp a efectului anticoagulantului circulant, pe lângă crearea unui deficit și în cele din urmă am identificat un studiu *in vitro*, mai vechi, care menționa ireversibilitatea reacției VKOR-anticoagulant [32]. Aceasta a dus la formularea modelului actual, în care încetarea efectului anticoagulant este dată de turnover-ul enzimei VKOR, calibrată ca să se conformeze rezultatelor din [34] și în care variabilitatea diurnă a INR-ului este considerabil mai mică.

#### 4.1 Reproducerea evoluției factorilor de coagulare și a INR-ului

Sistemul Warfarissimo reproduce dinamica medie a INR-ului sub tratament cu warfarină, la subiecți sănătoși, pentru intervalul 1–2.5 cu o eroare medie de 0.15, care poate fi considerată în limita erorilor de laborator curente pentru determinarea INR.

Reproducerea evoluției factorilor de coagulare și a INR-ului nu este exactă, existând diferențe de mică amplitudine, probabil irelevante pentru multe aplicații, dar sistematice. De exemplu, revenirea concentrației factorilor și a INR-ului este ceva mai rapidă în datele publicate decât în modelul nostru.

Evoluția în timp a concentrațiilor factorilor în modelul simulat și probabil la fiecare individ este o funcție exponențială (corespunzătoare cineticii de ordinul I). Media aritmetică a mai multor concentrații care evoluează după o lege exponențială nu variază însă tot exponențial (ar fi trebuit folosită, în schimb, media geometrică). Din această cauză un progres substanțial în ce privește precizia va putea fi obținut numai când vom dispune de date individuale.

Revenirea mai rapidă a INR-ului și a factorilor de

coagulare după încetarea tratamentului ar putea fi explicată de existența unui fenomen de *rebound*. Posibilitatea unui astfel de fenomen este evocată în unele studii, dar relevanța sa clinică fiind considerată redusă—mai ales în lipsa unei metode suficient de detaliate cantitativ ca să-l ia în calcul—este puțin studiat.

Un astfel de fenomen ar putea fi cauzat de exemplu de acumularea de precursori ne- $\gamma$ -carboxilați ai factorilor de coagulare, a căror concentrație crescută ar duce la o creștere substanțială a vitezei reacției de  $\gamma$ -carboxilare la încetarea administrării de antivitamină K. Creșterea raportului plasmatic între forma epoxid și forma neredusă a vitaminei  $K_1$  este documentată în literatură, astfel încât modelul nostru implementează acumularea și efectul de *rebound* corespunzător acestuia, dar acumularea precursorilor factorilor de coagulare nu este. Teoretic ar fi posibil și ca existența precursorilor în citoplasma hepatocitelor să primeze genele care îi sintetizează și fenomenul de *rebound* să nu apară în realitate.

Chestiunea ar putea fi clarificată și indirect dacă se dovedește pe cazuri individuale ca diferența în viteză de revenire nu este cauzată de erorile de mediere și dacă vom reuși să identificăm studii care să descrie cu suficientă precizie dinamica relației între diversele forme ale vitaminei K circulante și efectul anticoagulantelor.

Relația între concentrația factorilor de coagulare și valori toxice (peste 5) ale INR nu este studiată la om, cel puțin în bibliografia găsită de noi. Din această cauză precizia cu care modelul nostru reproduce astfel de valori este greu de estimat.

#### 4.2 Activitatea CYP2C9

În [25, 26] variabilitatea răspunsului indivizilor cu același genotip este considerabilă. Deși greutatea corporală, vârsta, și posibil alți factori contribuie la această variabilitate, este posibil ca expresia fenotipică

a celor două alele să fie variabilă.

Acest fapt este argumentat în studiul nostru prin diferența între nivelul de activitate al CYP2C9 corespunzător mediei dozei de întreținere cu acenocumaroal de 1.57mg/zi raportată în [26] pentru genotipul \*1\*3 și cea de 0.7mg/zi necesară unui caz \*1\*3 studiat în detaliu [24], comparativ cu un caz \*1\*1. Primei doze, presupunând că se referă la o greutate corporală de 70kg, îi corespunde o activitate a CYP2C9 de 0.4 iar celei de a doua o activitate de 0.1.

Nu putem exclude existența altor surse de variabilitate, fie genotipice, fie fenotipice, cum ar fi în afinitatea derivatului cumarinic pentru VKOR, în turnover-ul enzimei VKOR sau în aportul variabil de vitamină K, pe durată lungă. Combinarea modelării computerizate cu studii în care se dozează concentrația sanguină de anticoagulant, seriat în primele 24 de ore după o priză, la pacienți cu doză de întreținere cunoscută ar putea clarifica această chestiune.

Determinarea raportului între concentrația sanguină a enantiomerilor S și R ai warfarinei a fost indicată în studiul nostru ca fiind capabilă să diferențieze între genotipuri, dacă se admite că valoarea medie a dozei terapeutice necesare tratamentului de întreținere pentru fiecare genotip este reprezentativă pentru activitatea CYP2C9 a acelu genotip. Cu aceeași prezumție, determinarea raportului între aceste concentrații sanguine nu pare a fi ușor utilizabilă în practică pentru diferențierea între genotipuri la pacienții care primesc acenocumaroal ci cel mult pentru identificarea unei cauze genetice pentru unele cazuri de hipersensibilitate la acenocumaroal, cu expresie importantă a tipului \*3.

### 4.3 Răspunsul la încărcare

Efectul variabilității greutății corporale asupra răspunsului la un regim fix de încărcare (4mg acenocumaroal pe zi pentru 3 zile) pare a fi mai important decât variabilitatea CYP2C9. Cum există probabil și alte surse de variabilitate a răspunsului pare improbabil ca efectul unei scheme fixe de tratament asupra INR, administrat pe termen scurt, să se dovedească un test terapeutic foarte util în aprecierea genotipului.

Un alt factor perturbator important pentru interpretarea răspunsului la încărcare poate fi existența unui titru scăzut al factorilor de coagulare vitamin-K dependenți la începerea tratamentului, prin consum (de exemplu în tromboflebite), pierdere recentă de sânge (de exemplu postoperator) sau prin alte mecanisme.

### 4.4 Variabilitatea INR în tratamentul de întreținere

Studiul nostru propune, cu titlul de predicții ale modelului, două surse de variabilitate importantă a

INR în cursul tratamentului de întreținere: schemele terapeutice cu doză zilnică variabilă și neadministrarea medicamentelor la o oră fixă. În practică, la această variabilitate, se vor adăuga alte surse de variabilitate a răspunsului la INR, mai puțin controlabile și neluate în seama în scenariile noastre, cum ar fi efectul relației între momentul administrării medicamentelor și mese sau aportul alimentar variabil de vitamine K.

Chiar dacă în scenariile noastre doza medie administrată a fost cea ideală, pentru INR terapeutic conform calibrării, cele două surse de variabilitate menționate au fost suficiente pentru a face ca INR-ul să varieze între limita toxică și cea subterapeutică. Efectul a fost mai pronunțat în scenariile în care s-a urmărit o anticoagulare înaltă, care au loc pe un fond de nivel plasmatic mai redus al factorilor de coagulare.

În practică este de presupus că doza medie exactă nu este cunoscută, simpla determinare a două INR-uri în două zile succesive în gama terapeutică fiind de regulă considerată suficientă pentru a califica doza folosită recent ca fiind potrivită pentru pacient. Din această cauză, o variabilitate a INR-ului de 1–1.5 intrinsecă regimului administrat, când media INR nu va fi exact ținta terapeutică optimă, este suficientă pentru a explica eșecul menținerii tratamentului anticoagulant în limite terapeutice pentru 40% din timp (tabela 2). Ghidarea ajustării tratamentului după o determinare a INR care se află în afara marjei terapeutice în virtutea acestei variabilități, poate duce la instituirea unei doze eronate.

### 4.5 Concluzii

Pe baza literaturii existente s-a putut construi un model computerizat al efectului anticoagulantelor orale asupra INR care reproduce comportamentul mediu al subiecților sănătoși la administrarea de anticoagulante, făcând abstracție, în această versiune, de interacțiuni medicamentoase și alimentare.

Modelul nostru prezice surse importante de variabilitate a INR sub tratament: administrarea de regimuri de anticoagulant cu doză variabilă și neadministrarea medicamentului la aceeași oră în fiecare zi.

### Bibliografie

- [1] Jack Ansell, Jack Hirsh, James Dalen, Henry Bussey, David Anderson, Leon Poller, Alan Jacobson, Daniel Deykin, and David Matchar. Managing oral anticoagulant therapy. *Chest*, 119:22S–38S, 2001.
- [2] C S Landefeld, M W Rosenblatt, and L Goldman. Bleeding in outpatients treated with warfarin: relation to the prothrombin time and important remedial lesions. *Am J Med*, 87:153–159, 1989.
- [3] M J Gitter, T M Jaeger, and T M Petterson. Bleeding and thromboembolism during anticoagulant therapy: a population based study in Rochester, minnesota. *Mayo Clin Proc*, 70:725–733, 1995.

- [4] R J Beyth, L M Quinn, and S Landefeld. Prospective evaluation of an index for predicting the risk of major bleeding in outpatients treated with warfarin. *Am J Med*, 105:91–99, 1998.
- [5] J C Fosfar. Prediction of hemorrhage during long-term oral coumarin anticoagulation by excessive prothrombin ratio. *Am Heart J*, 103:445–446, 1982.
- [6] S D Fihn, M McDonnell, and D Martin. Risk factors for complications of chronic anticoagulation: a multicenter study. *Ann Intern Med*, 118:511–520, 1993.
- [7] F J M van der Meer, F R Rosendaal, and J P Vandenbroucke. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy: and analysis of risk factors. *Arch Intern Med*, 153:1557–1562, 1993.
- [8] S C Cannegieter, F R Rosendaal, and A R Wintzen. The optimal intensity of oral anticoagulant therapy in patients with nonrheumatic atrial fibrillation and recent cerebral ischemia. *New Engl J Med*, 333:5–10, 1995.
- [9] G Palaretti, N Leali, and S Coccheri. Bleeding and complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). *Lancet*, 348:423–428, 1996.
- [10] T Holm, J F Lassen, and S E Husted. Identification and surveillance of patient on oral anticoagulant therapy in a large geographic area—use of laboratory information systems. *Thromb Haemost*, 82(suppl):858–859, 1999.
- [11] R J Beyth and C S Landefeld. Prevention of major bleeding in older patients treated with warfarin: results of a randomised trial. *J Gen Intern Med*, 12:66, 1997.
- [12] P T Sawicki. A structured teaching and self-management program for patient receiving oral anticoagulation: a randomized controlled trial: working group for the study of patient self-management of oral anticoagulation. *JAMA*, 281:145–150, 1999.
- [13] B S P Hellemons, M Langenberg, and J Lodder. Primary prevention of arterial thromboembolism in non-rheumatic atrial fibrillation in primary care: randomized controlled trial comparing two intensities of coumarin with aspirin. *BMJ*, 319:958–964, 1999.
- [14] P Petersen, G Boysan, and J Godtfredsen. Placebo-controlled, randomized trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation: the copenhagen AFASAK study. *Lancet*, 341:175–179, 1989.
- [15] Boston Area Anticoagulation Trial for Atrial Fibrillation Investigators. The effect of low dose warfarin on the risk of stroke in patients with nonrheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 323:1505–1511, 1990.
- [16] Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: stroke prevention in atrial fibrillation III randomized clinical trial. *Lancet*, 348:633–638, 1996.
- [17] M D Ezekowitz, S L Bridgers, and K E Jmes. Warfarin in the prevention of stroke associated with nonrheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 327:1406–1412, 1992.
- [18] S J Connolly, A Laupacis, and M Cent. Canadian atrial fibrillation anticoagulation (cafa) study. *J Am Coll Cardiol*, 18:349–355, 1991.
- [19] A L Gullov, B G Koefoed, and P Petersen. Bleeding during warfarin and aspirin therapy in patients treated with atrial fibrillation: the AFASAK 2 study. *Arch Intern Med*, 159:1322–1328, 1999.
- [20] European Atrial Fibrillation Trial Study Group. Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischemic attack or minor stroke. *Lancet*, 342:1255–1262, 1993.
- [21] I Petitpas, A A Bhattacharya, S Twine, M East, and S Curry. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25):22804–22809, 2001.
- [22] Louis E Penrod, Joanne B Allen, and Leonard R Cabacungan. Warfarin resistance and enteral feedings: 2 case reports and a supporting in vitro study. *Arch Phys Med Rehabil*, 82:1270–1273, sep 2001. P9/2003.
- [23] Joel G Hardmann and E Limbird, Lee, editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGrawHill, 10 edition, 2002.
- [24] H K Thijssen, M J Drittij, L M T Vervoort, and J C de Vries-Hanje. Altered pharmacokinetics of r- and s-acenocoumarol in a subject heterozygous for cyp2c9\*3. *Clin Pharmacol Ther*, 70:292–298, 2001.
- [25] Craig R Lee, Joyce A Goldstein, and John A Pieper. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*, 12:251–263, 2002.
- [26] Dolores Tassies, Carolina Freire, Santiago Pijoan, Josefina Maragall, Joan Montegudo, Antoni Ordinas, and Joan Carles Reverter. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome p450-cyp2c9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica*, 87:1185–1191, 2002.
- [27] H K Thijssen, J P Flinois, and P H Beaune. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(1):1284–1290, 2000.
- [28] G P Aithal, C P Day, P J L Kesteven, and A K Daly. Association of polymorphisms in the cytochrome p450-cyp2c9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 353:717–719, 1999.
- [29] J Taube, D Halsall, and T Baglin. Influence of cytochrome p-450 cyp2c9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of overcoagulation in patients on long-term treatment. *Blood*, 96:1816–1819, 2000.
- [30] M Margaglione, D Colaizzo, G D Andrea, V Brancaccio, A Ciampa, and E Grandone. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*, 84:775–778, 2000.
- [31] D Cain, S M Hutson, and Reidar Wallin. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(46):29068–29075, 1997.
- [32] M J Fasco and L M Principe. R- and S-warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *J Biol Chem*, 257:4894–4901, 1982.
- [33] Saulius Butenas, Cornelis van’t Veer, and Kenneth G Mann. “normal” thrombin generation. *Blood*, 94(7):2169–2178, oct 1999.
- [34] D’Angelo Armando, Patrizia Della Valle, Luciano Crippa, Annalisa Fattorini, Elisabeta Pattarini, and Silvana Vigano D’Angelo. Relationship between international normalized ratio values, vitamin K-dependent clotting factor levels and *in vivo* prothrombin activation during the early and steady phases of oral anitcoagulant treatment. *Haematologica*, 87:1074–1080, 2002.
- [35] C Verstuyft, S Morin, A Robert, M A Loriot, P Beaune, P Jaillon, and L Becquemont. Early acenocoumarol overanticoagulation among cytochrome P450 2C9 poor metabolizers. *Pharmacogenetics*, 11:735–737, 2001.