

Standardizované postupy pro analýzu krevních destiček metodou průtokové cytometrie ve vztahu k riziku trombózy a krvácení

Marinov I., Luxová A., Tkáčová V.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

SOUHRN

Průtoková cytometrie hraje významnou roli v charakterizaci krevních destiček a v analýze jejich funkcí ve vztahu k riziku trombózy a krvácení. V klinické praxi se uplatňuje v diagnostice vrozených poruch funkce destiček, imunitních a megakaryocytárních trombocytopenií, v analýze polymorfie systému lidských trombocytárních antigenů (HPA) ve vztahu k aloimunizaci, neonatální trombocytopenii, potransfuzní purpře nebo refrakternosti na trombocytární přípravky. Klinicky významná je analýza aktivity cirkulujících destiček a stanovení trombocytárních mikročástic u pacientů s tranzitorní ischemickou atakou, akutním koronárním syndromem, kardiopulmonálním bypassesem. V posledních letech se průtoková cytometrie uplatňuje úspěšně v měření účinnosti antiagregační léčby inhibitory receptoru P2Y₁₂ a antagonisty komplexu IIb/IIIa. Relativním nedostatkem běžně používaných metod je nedostatečná standardizace a reprodukovatelnost. Cílem této práce je poskytnout přehled současných možností vyšetření krevních destiček a jejich funkcí metodou průtokové cytometrie v kontextu zavedených standardních postupů na našem pracovišti.

Klíčová slova: krevní destičky, průtoková cytometrie, standardizace.

SUMMARY

Marinov I., Luxová A., Tkáčová V.: Standardized techniques for platelet analysis by flow cytometry in relation to the risk of bleeding and thrombosis

Flow cytometry is a significant tool for platelet characterization and functional analysis in relation to the risk of bleeding and thrombosis. In clinical practice it is useful for the diagnosis of inherited platelet disorders, immune and megakaryocytic thrombocytopenias, for platelet HPA-1 polymorphism analysis in association with alloimmunization, neonatal alloimmune thrombocytopenia, post-transfusion purpura or refractoriness to platelet infusion. The analysis of platelet reactivity and platelet microparticles in patients with transitory ischemic attack, acute coronary syndrome or cardiopulmonary bypass is clinically significant. In recent years, flow cytometry plays an increasing role in monitoring of antiplatelet therapy with P2Y₁₂ receptor inhibitors and IIb/IIIa antagonists. Relative limitation of the majority of methods in use is poor standardization and reproducibility. The aim of this work is to review the potential role of flow cytometry analysis of platelets and their function in the context of the standardized techniques adopted in our laboratory.

Key words: platelets, flow cytometry, standardization.

Úvod

Výběr optimální metodiky pro analýzu funkce destiček se odvíjí od účelu vyšetření (tab. 1.). Krvácivost je jediný fyziologický test *in vivo*, je však nespecifický, má nízkou citlivost a subjektivní interpretaci. Vyšetření optickou nebo impedanční agregometrií umožňuje analýzu aktivity krevních destiček a monitorování účinnosti léčby kyselinou acetylsalicylovou (ASA), antagonisty receptoru P2Y₁₂ a inhibitory komplexu IIb/IIIa [1, 2]. Nevýhoda metody je nezbytnost okamžitého zpracování materiálu k vyšetření, nutnost velkého vzorku plazmy, časová náročnost a kolísavá reprodukovatelnost. *Verify Now* je rychlý, jednoduchý agregační test ze skupiny POCT (*point of care testing*), který umožňuje monitorování antiagregační terapie u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci [3]. Trombelastografie je metoda, která poměrně specificky hodnotí podíl krevních destiček na vzniku krevní sraženiny a tím umožňuje sledování účinnosti antiagregační léčby [4]. Význam stanovení Tromboxanu B2 v séru a 11-dehydro-tromboxanu B2 v moči je spojený s monitorováním

terapie kyselinou acetylsalicylovou. Nevýhodou však je existence jiných zdrojů tromboxanu B2 kromě destiček a nutnost korelovat koncentraci 11-dehydro-tromboxanu B2 s aktuální hodnotou kreatininu [1, 5].

Krevní destičky jsou metodou průtokové cytometrie snadno identifikovatelné, vyšetření se provádí z minimálního množství celkové krve (fyziologické prostředí) – je rychlé, umožňuje analýzu jak jednotlivých částic, tak i identifikaci a kvantifikaci jednotlivých subpopulací. Oproti ostatním vyšetřovacím metodikám má lepší reprodukovatelnost [1].

Diagnostika hereditární poruchy funkce destiček kvantitativní průtokovou cytometrií

Kvantifikace fluorescence metodou průtokové cytometrie znamená vyhodnocení světelné intenzity z vazby antigen-fluorochromem značené monoklonální protilátky v absolutních jednotkách. Kvantifikace fluorescence se provádí srovnáním fluorescenčního signálu s fluo-

Table 1. Methods for platelet activity analysis

Method	Principle	Clinical significance
Light transmittance aggregometry	Optical analysis of platelet aggregation in platelet rich plasma after stimulation with different agonists	Monitoring of antiplatelet therapy and clinical outcome
Impedance aggregometry	Impedance analysis of platelet aggregation in whole blood after stimulation with different agonists	Monitoring of antiplatelet therapy and clinical outcome
Thrombelastogram (TEG)	Analysis of platelet – fibrin clot formation and clot lysis in whole blood	Monitoring of antiplatelet therapy and clinical outcome
Flow cytometry	Analysis of P-selectin expression Analysis of activated IIb/IIIa expression Analysis of gp 53/CD63 expression Analysis of gp IV/CD36 expression Analysis of Ib/IX/V expression Analysis of platelet microparticles Analysis of VASP phosphorylation	Monitoring of antiplatelet therapy and clinical outcome
Immunoassay	Analysis of serum thromboxane B2 Analysis of urine 11 dehydro-tromboxane B2 Analysis of serum soluble CD40 ligand Analysis of serum gp V	Monitoring of antiplatelet therapy

rescencí externího standardu pro přímou fluorescenci (*Quantibrite-BD Biosciences, Quantum simply cellular – Bangs Laboratories Inc.*), nepřímou fluorescenci (*Qifikit-Dako, Cellquant – Biocytex*) nebo pro přímou a nepřímou fluorescenci (*Quantum Beads – Bangs Laboratories Inc.*). Z průměrné fluorescenční intenzity (MFI) jednotlivých populací standardních kuliček a na bázi předem definovaného množství na kuličkách navázaných protilátek molekul imunoglobulinu nebo molekul fluorochromu se připravuje standardní křivka, ze které lze interpolovat množství na buňkách navázaných protilátek odpovídající konkrétní MFI (obr. 1).

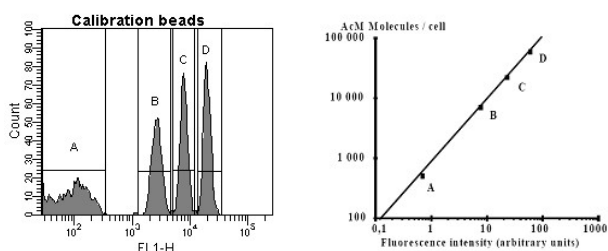


Fig. 1. Calibration curve is prepared by determining the mean fluorescence intensity values (MFI) of calibration standards with precisely defined amounts of bound antibodies, immunoglobulin or fluorochrome molecules. From the standard curve we interpolate the amount of antibodies bound to cells with corresponding MFI.

Glanzmannova trombastenien, Bernardův-Soulierův syndrom a syndrom šedých destiček jsou vrozené poruchy funkce krevních destiček, které se vyznačují částečným nebo kompletním deficitem glykoproteinů IIb/IIIa, Ib/IX/V nebo P-selektinu (tab. 2). Klinicky se projevují krvácením [6]. Kvalitativní vyšetření zmíněných glykoproteinů má orientační význam. Kvantifikace antigenní exprese v absolutních jednotkách sABC (specific antibody binding capacity) je pro diagnostiku me-

todou volby, navíc umožňuje stanovení homozygotní nebo heterozygotní formy onemocnění. V tabulkách 3 a 4 jsou uvedené hodnoty destičkových glykoproteinů u normálních dárců a pacientů s Glanzmannovou trombastenii, stanovené standardizovanou soupravou PLT Gp/Receptor (Biocytex, Francie).

Table 2. Hereditary platelet disorders

Name	Defect	Target marker for diagnosis
Glanzmann thrombastenia	Gp IIb/IIIa (CD41/CD61)	Gp IIb (CD41)
Syndrome Bernard Soulier	Gp Ib/IX/V (vWF receptor)	GpIba (CD42b)
Grey platelet syndrome	P-Selectin (CD62P)	GMP 140 (CD62P)

Table 3. Normal values of platelet glycoproteins in absolute sABC (specific antibody binding capacity) units determined with the standardized PLT Gp/Receptors kit (Biocytex, France)

	Basal state	After activation with TRAP
GMP 140 (CD62P)	< 1000	≥ 1000
GpIIb (CD41)	51000 ± 14000	85000 ± 27000
GpIba (CD42b)	38000 ± 11000	19000 ± 10000

Diagnostika imunitních trombocytopenií semikvantitativní průtokovou cytometrií

Trombocytopenie vzniká na základě poruchy megakaryopoézy, zvýšené destrukce, konzumpce nebo ztráty krevních destiček. Imunitní trombocytopenie

Table 4. Typical findings in homozygous and heterozygous forms of Glanzmann thrombastenia determined with the standardized PLT Gp/Receptors kit (Biocytex, France)

		Basal state	After activation with TRAP
Homozygous form	GMP 140 (CD62P)	< 1000	6000
	Gp IIb (CD41)	1300	2000
	Gp Ib (CD42b)	41000	32000
Heterozygous form	GMP 140 (CD62P)	< 1000	11600
	Gp IIb (CD41)	28000	51000
	Gp Ib (CD42b)	40000	33000

vzniká následkem zvýšené sekvestrace a destrukce destiček v retikulo-endoteliálním systému (RES) v důsledku produkce protideštičkových protilátek, většinou typu IgG, namířených proti membránovým glykoproteinům gp IIb/III nebo gp Ib/IX [7]. Destičky s navázanými protilátkami jsou odstraněny z cirkulace fagocytózou nebo komplemtem indukovanou lýzou. Diagnostika imunitních trombocytopenií spočívá v detekci a kvantifikaci na destičkách vázaných imunoglobulinů průtokovou cytometrií (tab. 5). Obrázek 2 znázorňuje vlastní výsledky potvrzující statisticky významné rozdíly v hodnotách celkových imunoglobulinů vázaných na destičkách u pacientů s imunitní trombocytopenií (n = 20) oproti normálům (n = 15) za použití standardizované soupravy Thrombocyttest Immune (Glycotope, Německo) a dvouvýběrového t-testu (GraphPad Prism 4).

Table 5. Values of platelet associated immunoglobulins in healthy donors expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Analysis was performed with the standardized Thrombocyttest Immune kit (Glycotope, Germany)

	95% range	Median
Ig	< 16.6	11.1
IgA	< 6.9	4.4
IgG	< 14.4	6.7
IgM	< 14.3	6.7
Negative control	< 4.5	1.8

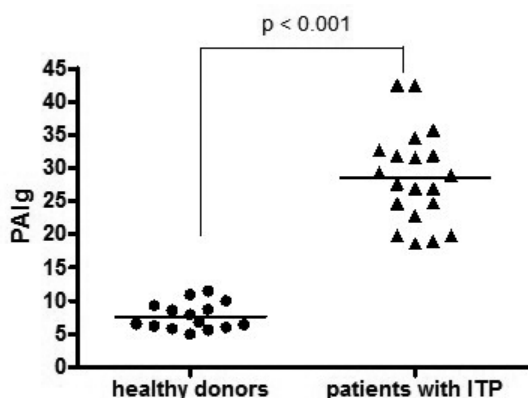


Fig. 2. Statistically significant differences in whole amounts of platelet associated immunoglobulins (IgM, IgA, IgG) expressed as mean fluorescence intensity (MFI) in patients with immune thrombocytopenia compared to healthy donors. Analysis was performed with the standardized Thrombocyttest Immune kit (Glycotope, Germany) and the unpaired t-test (GraphPad Prism 4).

Diagnostika megakaryocytárních trombocytopenií průtokovou cytometrií

Retikulované destičky představují frakci krevních destiček čerstvě vyplavených do cirkulace, charakterizovaných zbytkovým množstvím ribonukleové kyseliny [9]. Jejich vztah k megakaryopoéze je analogický vztahu retikulocytů k erytropoéze, přičemž měření počtu retikulovaných destiček lze monitorovat celkový trombocytární obrát (obr. 3). Analýzou retikulovaných destiček průtokovou cytometrií odlišujeme poruchy megakaryopoézy (aplastická anémie, myelodysplastický syndrom, akutní leukémie) od trombocytopenií ze zvýšené destrukce, konzumpce nebo ztráty krevních destiček (trombotická trombocytopenická purpura, trombocytopenie při sepsi, diseminovaná intravaskulární koagulopatie, Kasabach-Merrittův syndrom, hypersplenismus) nebo sekundárních imunitně podmíněných trombocytopenií (kolagenózy, systémový lupus erythematosus, antifosfolipidový syndrom, autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, chronická lymfatická leukémie, virové infekce).

Obrázek 4 znázorňuje statisticky významné rozdíly v hodnotách retikulovaných destiček u pacientů s imunitní trombocytopenií a aplastickou anémií oproti zdravým dárcům – stanoveno standardizovanou soupravou Thrombocyttest Plus (Glycotope, Německo) a jednostrupňovou ANOVA (GraphPad Prism 4).

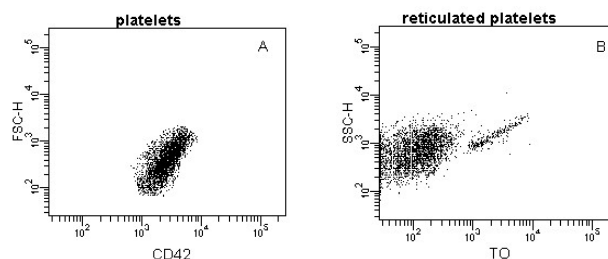


Fig. 3. Reticulated platelets are identified following incubation of platelets (A) with fluorescent dye binding to residual platelet RNA (B)

Stanovení absolutního počtu krevních destiček průtokovou cytometrií

Od skutečné trombocytopenie je nutno odlišovat nepravou (pseudo-) trombocytopenii, která může vzniknout z důvodu shlukování krevních destiček při odběru do EDTA, chladové aglutinace destiček, ale také z důvodu nesprávného sečtení hematologickým analyzátozem, který často zařazuje trombocytární shluky

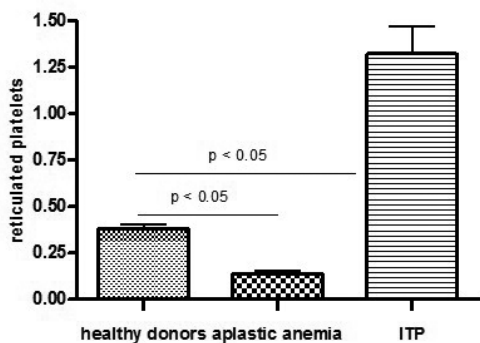


Fig. 4. Statistically significant differences in reticulated platelets (% of whole platelet count) in patients with aplastic anemia and immune thrombocytopenia compared to healthy donors

Analysis was performed with the standardized Thrombocyt-test Plus kit (Glycotope, Germany) and the one-way ANOVA test (GraphPad Prism 4).

ky k malým lymfocytům. Referenční metodou na stanovení počtu krevních destiček je metoda imunologická [10], která spočívá v identifikaci krevních destiček na základě exprese trombocytárních znaků CD41/CD61 s následným stanovením absolutního počtu destiček ve vztahu k počtu erytrocytů získaných z hematologického analyzátoru (obr. 5).

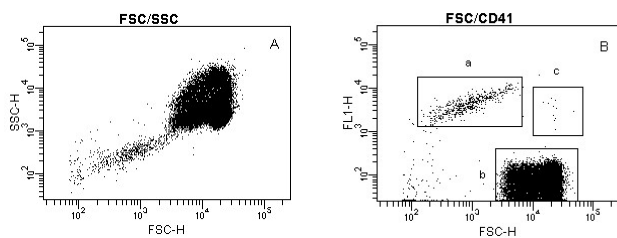


Fig. 5. RBC/PLT ratio is defined according the formula: $RBC/PLT = b + c/a + c$ (b: red blood cell events, a: platelet events, c: coincidence events)

Absolute platelet count is determined dividing the number of erythrocytes from the hematological analyser by the RBC/PLT ratio.

Stanovení aktivity krevních destiček průtokovou cytometrií

Trombocytární hyperreaktivita (zvýšené procento cirkulujících aktivovaných destiček) i hyporeaktivita hrají důležitou patogenetickou roli v řadě klinických stavů: nestabilní stenokardie, akutní infarkt myokardu, kardiopulmonální bypass, tranzitorní ischemická ataka, diabetes mellitus, hyperlipoproteinémie, centrální mozková příhoda, stres, kouření, intraventrikulární krvácení u nedonošených novorozenců [11]. Průtokovou cytometrií lze monitorovat aktivační stav destiček *in vivo* nebo nepřímo hodnotit schopnost destiček aktivovat se *in vitro* po přidání trombocytárních agonistů (thrombin/glycyl-L-propyl-L-arginyl-L-proline, ADP, TRAP-6 nebo ionomycin). Zvýšená odpověď po stimulaci (*priming*) poukazuje na nízkou *in vivo* preaktivaci. V klinické praxi hodnotíme převážně aktivační stav destiček *in vivo*. Vyšetření provádíme ihned po odběru nebo po fixaci krevních destiček příslušným činidlem.

Stanovení reaktivity krevních destiček analýzou exprese povrchových aktivačních markerů

Aktivační stav krevních destiček stanovujeme expresí membránových struktur souvisejících s aktivací destiček [12, 13]. V praxi stanovujeme expresi aktivovaného komplexu gp IIb/IIIa (PAC1), P-selektinu (CD62P), gp 53 (CD63), méně často zvýšenou expresi gp IV (CD36) nebo sníženou expresi komplexu Ib/IX/V (CD42). Vazbu fluorochromem značené monoklonální protilátky na cílový glykoprotein vyjadřujeme kvalitativně (procento pozitivních destiček oproti negativní kontrole) nebo semikvantitativně (průměrná fluorescenční intenzita). Často se setkáváme se slabou, obtížně prokazatelnou fluorescenční intenzitou, proto analýzu v naší laboratoři provádíme převážně kvantitativně, kdy intenzitu exprese jednotlivých markerů hodnotíme v absolutních arbritárních jednotkách ABC (antibody binding capacity) nebo MESF (Molecules Equivalent Soluble Fluorochrome) za použití standardního kalibrátoru (PLT Calibrator, Biocytex, Francie).

Stanovení aktivity krevních destiček analýzou procesu intracytoplazmatické signalizace

VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) je intracelulární protein, jehož fosforylace při inhibici krevních destiček je regulována kaskádou cyklické adenosinmonofosfatázy (cAMP). Prostaglandin E1 (PGE1) kaskádu aktivuje, zatímco adenosindifosfát (ADP) kaskádu via P2Y12 receptoru inhibuje (obr. 6). Fosforylace VASP koreluje s inhibicí P2Y12 receptoru a tím způsobuje

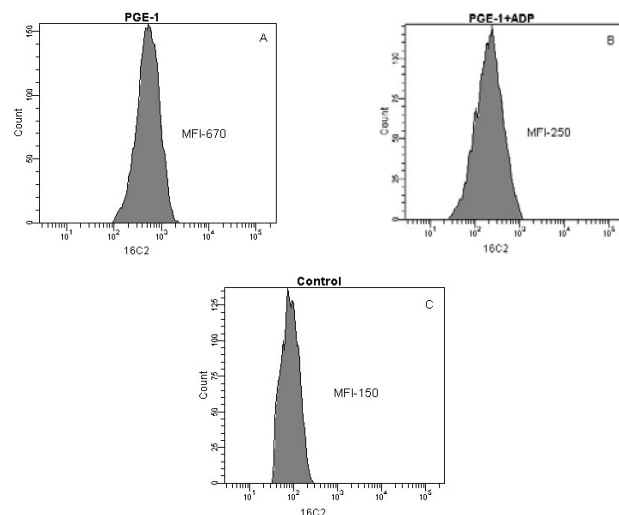


Fig. 6. Platelets are incubated with PGE1 alone (A) and PGE1+ADP (B)

Following permeabilisation, VASP phosphorylation (VASP-P) is detected by indirect fluorescence using the monoclonal antibody 16C2. Platelet reactivity index (PRI) calculated according the formula: $PRI = [(MFI_{(PGE1)} - MFI_{(PGE1+ADP)}) / MFI_{(PGE1)}] \times 100$ defines the capacity of ADP to block VASP phosphorylation ($MFI_{(PGE1)} = MFI_{(PGE1)} - MFI_{(control)}$, $MFI_{(PGE1+ADP)} = MFI_{(PGE1+ADP)} - MFI_{(control)}$).

bem umožňuje *ex vivo* monitorování účinnosti antagonistů ADP receptoru [14,15]. Naše výsledky potvrzují významnou individuální variabilitu odpovědí na terapii thienopyridiny (obr. 7), větší riziko vzniku trombotických komplikací u pacientů s horší „laboratorní“ odpovědí (rezistence) na clopidogrel a účelnost laboratorního sledování účinnosti antiagregační léčby [16, 17].

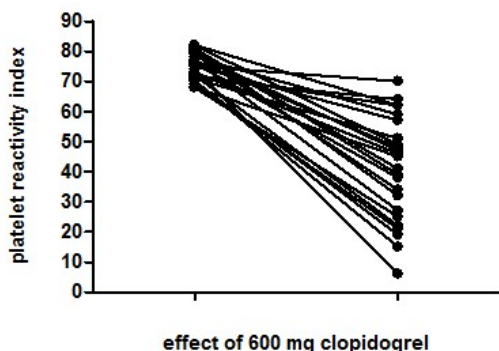


Fig. 7. Individual variability of platelet reactivity index (PRI) following 600 mg clopidogrel loading dose, defined by the standardized PLT VASP/P2Y12 kit (Biocytex, France)

Stanovení reaktivity krevních destiček průtokovou cytometrií stanovením volných vazebných míst komplexu gp IIb/IIIa

Chimérický Fab fragment monoklonální protilátky 7E3 (antagonista komplexu gp IIb/IIIa) je klinicky významnou látkou s antiagregačním účinkem. Po aplikaci se protilátka váže na receptory gp IIb/IIIa. Detekci „volných vazebných míst“ komplexu gp IIb/IIIa za použití fluorochromem značené monoklonální protilátky 7E3 (snížená nebo nepřítomná fluorescence) lze monitorovat účinnost léčby gp IIb/IIIa antagonisty (Abciximab/ReoPro) [19, 20].

Analýza HPA-1 polymorfie metodou průtokové cytometrie

Polymorfie systému lidských trombocytárních antigenů (HPA) je častou příčinou aloimunitizace, která se v praxi projevuje fetomaternální a/nebo neonatální trombocytopenií, potransfuzní purpurou (PTP) nebo refrakterností na trombocytární přípravky. HPA-1 je polymorfní aloantigenní epitop v rámci komplexu gp IIb/IIIa, který má dvě izoformy: HPA-1a a HPA-1b. HPA-1a je nejčastější příčinou klinických komplikací a vzniká důsledkem mutace 176T > C genu ITGB3, která vede k modifikaci gp IIIa. Kromě klasické PCR genotypizace, která je finančně a časově náročná, lze metodou průtokové cytometrie definovat tři genotypy: HPA-1a/1a (PL^{A1/A1}), HPA-1a/1b (PL^{A1/A2}) a HPA-1b/1b (PL^{A2/A2}). Kromě zmíněných patologických stavů se genotyp HPA-1b/1b vyskytuje častěji u pacientů s koronárním syndromem, paroxysmální noční hemoglobinurií a trombofilií.

Stanovení trombocytárních mikročástic

Trombocytární mikročástice jsou produkty trombocytární membrány a vznikají po aktivaci krevních destiček. Na svém povrchu exprimují specifické trombocytární glykoproteiny (CD41, CD42, CD61). Zmnožení trombocytárních mikročástic zaznamenáváme u idiopatické trombocytopenické purpury, tranzitorní ischemické ataky, akutního koronárního syndromu a u pacientů s kardiopulmonálním bypassesem. Klinický význam vyšetření průtokovou cytometrií spočívá v hodnocení potenciálních trombotických komplikací vzhledem k jejich prokoagulační aktivitě (hyperkoagulační stav).

Velikostně jsou mikročástice na hranici citlivosti většiny průtokových cytometrů, což značně ztěžuje analýzu a standardizaci metodiky. V poslední době se objevují fluorochromem značené externí standardy, které umožňují správnou kalibraci přístrojů k měření částic o velikosti 0,5–1,0 μm.

Závěr

Vyšetření krevních destiček a jejich funkce má diagnostický, patogenetický a prognostický význam pro řadu patologických stavů v hematologii, transfuzní medicíně, neurologii, kardiologii, kardiochirurgii a jiných klinických oborech. Analýza metodou průtokové cytometrie má oproti běžně používaným metodikám nesporné výhody: provádí se z malého množství celkové krve, je rychlá, umožňuje analýzu nízkých počtů krevních destiček nebo jednotlivé destičky, má kvantitativní charakter. Hlavní výhodou je však lepší reprodukovatelnost a standardizace, což umožnilo vznik širokého spektra standardizovaných diagnostických postupů.

Literatura

1. **Michelson, A. D.** Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*, 2004, 110, s. e489–493.
2. **Yee, D. L., Sun, C. W., Bergeron, A. L., Dong, J. F., Bray, P. F.** Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood*, 2005, 106, s. 2723–2729.
3. **Smith, J. W., Steinhubl, S. R., Lincoff, A. M. et al.** Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation*, 1999, 99, s. 620–625.
4. **Tantry, U. S., Bliden, K. P., Gurbel, P. A.** Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005, 46, s. 1705–1709.
5. **Gurbel, P. A., Kereiakes, D. J., D'Alesandro, M. R., Bahr, R. D., O'Connor, C. M., Serebruany, V. L.** Role of soluble and platelet-bound P-selectin in discriminating cardiac from noncardiac chest pain at presentation in the emergency department. *Am. Heart J.*, 2000, 139, s. 320–328.
6. **Jennings, L. K., Ashmun, R. A., Wang, W. F., Dockter, M. E.** Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood*, 1986, 68, s. 173–179.

7. **Nishioka, T., Yamane, T., Takubo, T., Ohta, K., Park, K., Hino, M.** Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2005, 68, 1, s. 37–42.
8. **Marinov, I., Salaj, P., Svorcova, V., Volkova, Z., Mikulenková, D.** Quantitative flow cytometric analysis of platelet associated immunoglobulins in patients with immune thrombocytopenia. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2008, 30, S1, s. 112.
9. **Macchi, I., Chamlian, V., Sadoun, A. et al.** Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur. J. Haematol.*, 2002, 69, s. 152–157.
10. **Klee, G., van Assendelft, O. et al.** Platelet counting by the RBC/platelet ratio method. A reference method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2001, 115, s. 460–464.
11. **Lind, S. E.** The bleeding time. In: Michelson, A. D., editor. Platelets. 2nd edition. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press, 2007, s. 485–493.
12. **Shattil, S. J., Cunningham, M., Hoxie, J. A.** Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 1987, 70, s. 307–315.
13. **Abrams, C., Shattil, S. J.** Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thrombosis and Haemostasis*, 1991, 65, s. 467–473.
14. **Aleil, B., Ravanat, C., Cazenave, J. P. et al.** Flow cytometric analysis of intra-platelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3, s. 85–92.
15. **Barragan, P., Bouvier, J. L., Roquebert, P. O., Macaluso, G., Commeau, P., Comet, B., Lafont, A., Camoin, L., Walter, U., Eigenthaler, M.** Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc. Interv.*, 2003, 59, s. 295–302.
16. **Motovska, Z., Widimsky, P., Petr, R., Bilkova, D., Hajkova, J., Marinov, I., Simek, S., Kala, P.** Optimal pretreatment timing for high load dosing (600mg) of clopidogrel before percutaneous coronary intervention for maximal antiplatelet effectiveness. *Int. J. Cardiol.*, 2010, in press.
17. **Motovska, Z., Widimsky, P., Petr, R., Bilkova, D., Marinov, I., Simek, S., Kala, P.** Factors influencing clopidogrel efficacy in patients with stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention: statin's advantage and the smoking „paradox“. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2009, 53, 5, s. 368–372.
18. **Bhatt, D. L., Topol, E. J.** Current role of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *JAMA*, 2000, 284, s. 1549–1558.
19. **Wu, K. K., Willerson, J. T.** Monitoring platelet function in glycoprotein IIb/IIIa inhibitor therapy. *Circulation*, 2001, 103, s. 2528–2530.

Do redakce došlo dne 9. 7. 2010.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Iuri Marinov, CSc.
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1
128 20 Praha 2
e-mail: luri.Marinov@uhkt.cz