

## Correlation between P-Selectin Level and Left Atrial Function in Rheumatic Mitral Stenosis

Prafithrie Avialita Shanti, Yoga Yuniadi, Nur Haryono

**Background.** Mitral stenosis (MS) prevalence remains significant in developing countries because of the prevalence of Rheumatic Heart Disease (RHD). In moderate-severe MS patients, enormous increase in turbulent region and shear stress cause vascular endothelial dysfunction, and as the consequence, it increases the risk of thromboembolic complications. P-selectin is an adhesion molecule that play a role in the inflammation process, where it is expressed rapidly in mere minutes. Left Atrial Volume Index (LAVI) is a superior parameter compared with other two-dimensional echocardiography method to assess left atrial function.

**Methods.** This was a cross-sectional study involving 20 MS moderate-severe patients with mitral valve area (MVA) < 1.5 cm<sup>2</sup>, to whom successful Percutaneous transvenous Balloon Mitral Valvulotomy (PBMV) was performed. Samples were taken consecutively from May-October 2013 at the National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta. Blood samples of P-selectin were collected pre and post-PBMV. The result was statistically analyzed with echocardiography data of LAVI prior PBMV to describe any association between expression of P-selectin and atrial function.

**Result.** We found no association between LAVI and P-selectin level pre and post-PBMV in MS patients. That is described in the value of pre PBMV  $\beta = -0.103$  (95% CI -0.251-0.045) with  $p = 0.16$  and post-PBMV  $\beta = 0.009$  (95% CI -0.155-0.172) with  $p = 0.91$ . We then performed linear regression test with adjusted confounding variable including sex, age, and atrial fibrillation, still we found no association between LAVI and P-selectin level, with the value of pre PBMV  $\beta = -0.154$  (95% CI -0.340-0.032)  $p = 0.09$  and post PBMV  $\beta = -0.049$  (95% CI -0.250-0.152)  $p = 0.61$ .

**Conclusion.** There is no difference in P-selectin level pre and post PBMV. There is no association between poor LAVI value and expression of P-selectin pre and post PBMV in MS.

(J Kardiol Indones. 2014;35:150-6)

**Keywords:** P-selectin, LAVI, mitral stenosis, rheumatic heart disease

Department of Cardiology and Vascular Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, and National Cardiovascular Center Harapan Kita, Jakarta

## Hubungan Kadar P-selectin dengan Fungsi Atrium Kiri pada Stenosis Mitral Rematik

Prafithrie Avialita Shanti, Yoga Yuniadi, Nur Haryono

**Latar Belakang.** Stenosis Mitral (SM) tinggi prevalensinya di negara berkembang karena erat terkait dengan prevalensi penyakit jantung demam rematik (PJR). Pasien SM sedang-berat terdapat peningkatan regio turbulensi dan shear stress mengakibatkan kerusakan endotel pembuluh darah sehingga meningkatkan resiko tromboemboli. P-selectin sebagai molekul adhesi berperan dalam proses inflamasi dan faktor protrombotik yang diekspresikan secara cepat. Indeks volume atrium kiri (IVAK) merupakan parameter superior untuk mengukur fungsi atrium kiri dengan ekokardiografi.

**Metode.** Penelitian potong lintang melibatkan 20 pasien SM sedang-berat dengan MVA <1.5 cm<sup>2</sup> yang menjalani Komisuratomitri Mitral Transvena Perkutan (KMTP) yang diambil secara konsekutif pada bulan Mei 2013 sampai Oktober 2013 di Pusat Jantung Nasional Harapan Kita Jakarta. Pasien diambil sampel darah pra dan pasca KMTP untuk diperiksa kadar P-Selectin dan hasilnya dianalisa secara statistik.

**Hasil.** Dalam studi ini, tidak didapatkan asosiasi antara IVAK dengan ekspresi kadar P-selectin pra dan pasca KMTP. Hal ini ditunjukkan dengan nilai pra KMTP  $\beta = -0.103$  (95% CI -0.251,0.045)  $p=0.16$  dan pasca KMTP  $\beta = 0.009$  (95% CI -0.155,0.172)  $p=0.91$ . Setelah dilakukan regresi linier dengan penyesuaian (adjusted) terhadap variabel perancu yakni usia, jenis kelamin, dan atrial fibrilasi tetap tidak didapatkan asosiasi antara IVAK dengan kadar P-selectin dengan nilai pra KMTP  $\beta = -0.154$  (95% CI -0.340,0.032)  $p=0.09$  dan pasca KMTP  $\beta = -0.049$  (95% CI -0.250,0.152)  $p=0.61$ .

**Kesimpulan.** Tidak ada perbedaan nilai P-selectin pra dan pasca KMTP. Nilai IVAK buruk tidak berhubungan dengan kadar P-selectin pra dan pasca KMTP pada pasien SM.

(J Kardiol Indones. 2014;35:150-6)

**Kata Kunci:** P-selectin, IVAK, stenosis mitral, penyakit jantung rematik

### Latar Belakang

Stenosis mitral (SM) masih tinggi prevalensinya di negara-negara berkembang karena kaitannya yang erat dengan prevalensi penyakit jantung rematik (PJR).<sup>1</sup> Pada

SM, terjadi progresivitas dari penebalan jaringan parut dan kalsifikasi pada korda dan daun katup mitral mengakibatkan berkurangnya area pembukaan katup mitral (obstruksi). Akibat adanya obstruksi ini, terbentuk perbedaan tekanan saat diastolik pada katup tersebut yang menyebabkan peningkatan tekanan atrium kiri dan vena pulmonalis. Peningkatan tekanan atrium kiri menyebabkan pembesaran ruang dan volume darah atrium kiri yang menjadi predisposisi terjadinya fibrilasi atrial dan trombosis, yang terlihat dari kesesuaian keadaan ini dengan trias Virchow, yaitu adanya stasis atau perlambatan aliran darah, integritas dinding endotel

### Alamat Korespondensi

dr. Prafithrie Avialita Shanti SpJP. Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular FKUI/Pusat Jantung Nasional Harapan Kita, Jakarta. Tel/E-mail: yogayl36@gmail.com

terganggu yang menyebabkan peningkatan ekspresi molekul adhesi, serta kondisi hiper koagulabilitas. Pada SM sedang sampai berat, terdapat peningkatan regio turbulensi dan *shear stress* yang cukup besar mengakibatkan kerusakan endotel pembuluh darah dan elemen selular darah yang dapat meningkatkan risiko tromboemboli.<sup>2</sup> Salah satu komplikasi tromboemboli yang serius pada SM adalah stroke yaitu mencapai 20% dan bahkan meningkat hingga 18 kali lipat jika disertai fibrilasi atrial.<sup>3</sup>

Evaluasi dimensi dan fungsi atrium kiri terbukti secara konsisten menjadi prediktor kuat untuk fibrilasi atrial, gagal jantung, stroke, evaluasi kapasitas fungsional dan kematian.<sup>4,5</sup> Diameter atrium kiri yang diukur dengan ekokardiografi pada pandangan *parasternal long axis* dan *M-mode* merupakan metode sederhana dan telah banyak digunakan pada uji klinis.<sup>6</sup> Akhir-akhir ini berkembang parameter indeks volume atrium kiri (IVAK) yang lebih superior dibandingkan metode 2 dimensi lainnya untuk mengukur fungsi atrium kiri.<sup>4</sup> IVAK adalah volume atrium kiri disesuaikan dengan *body surface area* (BSA). Pengukuran IVAK memiliki variasi inter dan intra-observer yang kecil.<sup>7</sup>

Selain faktor hemodinamik, trombosis juga berkaitan dengan proses inflamasi dengan peran beberapa mediator inflamasi.<sup>8</sup> P-selectin merupakan salah satu molekul adhesi yang berperan dalam proses inflamasi dan merupakan faktor protrombotik. P-selectin diekspresikan secara cepat oleh sel endotel dalam hitungan menit setelah diaktivasi oleh thrombin atau histamin.<sup>9,10</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan kadar P-selectin terkait dengan severitas SM.<sup>11</sup> Saat ini komisurotomi mitral transvena perkutan (KMTP) merupakan prosedur standar dalam tatalaksana SM yang terbukti efektif untuk memperbaiki bukaan katup mitral.<sup>12</sup> Belum jelas hubungan antara perubahan fungsi atrium kiri pasca KMTP terhadap berbagai mediator inflamasi, khususnya molekul adhesi.

## Metodologi Penelitian

### Subyek

Penelitian ini merupakan studi potong lintang yang dilakukan pada pasien dengan diagnosis stenosis mitral akibat penyakit jantung rematik derajat sedang sampai berat ( $MVA < 1.5 \text{ cm}^2$ ) yang menjalani KMTP dengan skor Wilkin  $< 8$ . Kategori SM sesuai dengan Guideline ekokardiografi.<sup>13,14</sup>

Semua pasien SM dilakukan KTMP, pelebaran bukaan katup mitral yang menyempit pada pasien SM menggunakan balon kateterisasi. Indikasi dilakukannya adalah pada SM sedang sampai berat dengan  $MVA < 1,5 \text{ cm}^2$ , tanpa regurgitasi katup mitral sedang sampai berat dan simtomatik dengan kelas fungsional NYHA  $\geq 2$ , skor Wilkin  $< 8$  tanpa trombus di atrium kiri. Keberhasilan KMTP bila  $MVA > 1,5 \text{ cm}^2$  tanpa regurgitasi katup mitral sedang sampai berat.<sup>15</sup>

Penelitian dilakukan di Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/Pusat Jantung Nasional Harapan Kita Jakarta pada periode Mei 2012 - Oktober 2013. Kriteria eksklusi meliputi pasien dengan trombus di atrium kiri serta tidak bersedia mengikuti penelitian. Subyek yang memenuhi persyaratan sebagai populasi penelitian dievaluasi data demografi, klinis dan kateterisasinya. Penelusuran data demografi dan klinis dilakukan melalui wawancara, pemeriksaan klinis dan rekaman medis. Parameter yang dicatat sesuai dengan definisi operasional yang telah ditetapkan.

### Definisi Operasional Ekokardiografi

Pada subyek penelitian dilakukan pengambilan data ekokardiografi, meliputi diameter atrium kiri, IVAK, MVA, mMVG, skor Wilkin. Pasien dengan penyempitan katup mitral dapat disebabkan oleh berbagai faktor yang tersering penyakit jantung rematik, yang dibuktikan dengan pengukuran area katup mitral dengan ekokardiografi. Mitral stenosis sedang bila  $MVA < 1,5 \text{ cm}^2$  dan mitral stenosis berat bila  $MVA < 1 \text{ cm}^2$ .<sup>13</sup> Pra KMTP  $MVA < 1,5 \text{ cm}^2$ , diukur dengan ekokardiografi (data dasar), saat tindakan pra KMTP dan pasca KMTP.

Fungsi atrium kiri dinilai lewat tiga aspek, yaitu sebagai *reservoir*, *conduit* dan *pump*. Data fungsi atrium kiri tersebut diambil dengan ekokardiografi IVAK. IVAK menjadi parameter superior untuk mengukur fungsi atrium kiri dibanding metode 2 dimensi ekokardiografi lainnya. Dikatakan normal bila  $< 28 \text{ ml/m}^2$ , meningkat berat bila  $> 40 \text{ ml/m}^2$ .<sup>16</sup> Untuk mMVG, subyek dengan nilai rata-rata tekanan katup mitral  $> 5 \text{ mmHg}$ , diukur dengan ekokardiografi (data dasar), saat tindakan pra KMTP dan pasca KMTP. Skor Wilkin subyek penelitian ini adalah  $< 8$  yang memenuhi kriteria KMTP.

### Kadar P-selectin darah

Dilakukan pengambilan sampel darah di atrium kiri pra KMTP, yang diambil di atrium kiri saat sebelum balon

**Tabel 1.** Tabel karakteristik dasar subyek penelitian

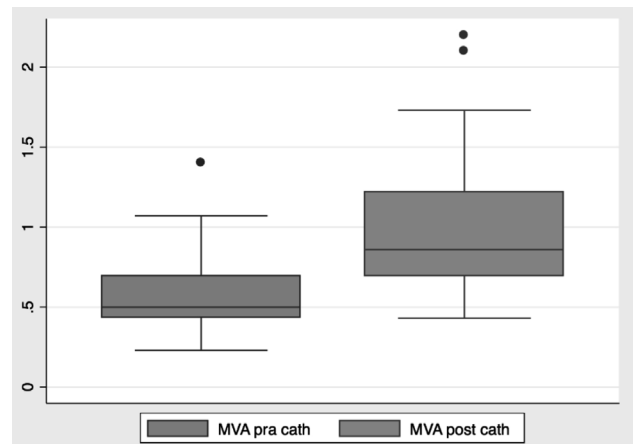
Nama variabel	Frekuensi (Persentase) (n=20)
<b>Jenis Kelamin</b>	
Perempuan	15 (75%)
Laki-laki	5 (25%)
<b>Elektrokardiografi</b>	
Fibrilasi atrial	10 (50%)
Irama sinus	10 (50%)
<b>Usia Rerata</b>	
<55 tahun	17 (85%)
≥55 tahun	3 (15%)
Median waktu ambil (WIB)	13.30 (9-20)
<b>Ekokardiografi</b>	
MVA	0,75 ± 0,25
mMVG	10,95 ± 3,3
Wilkin score	7 (4-8)
Diameter	48,1 ± 5,2
IVAK	86,95 ± 41,4
Fraksi Ejeksi	60,9 ± 6,25

IVAK= Indeks Volume Atrium Kiri, MVA= Mitral Valve Area, mMVG= mean Mitral Valve Gradient, WIB= Waktu Indonesia Barat

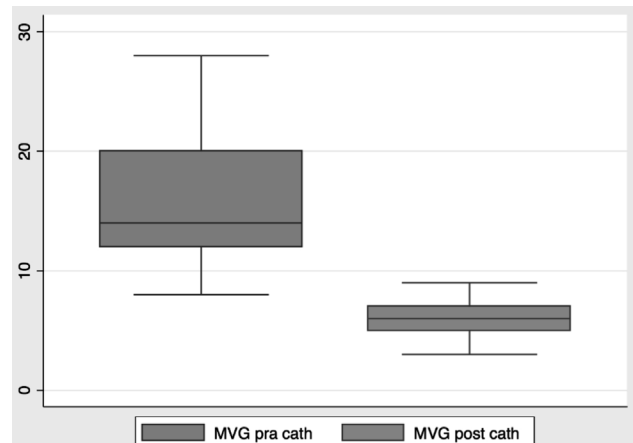
KMP mendilatasi katup mitral, dan pasca KMTP, setelah (10 menit) balon KMTP mendilatasi katup mitral, saat pasien menjalani KMTP. Kadar P-selectin diperiksa dalam darah dengan reagen sP-Selectin Microplate anti koagulan EDTA, metode Immunoassay, rentang standar 0.99-54.6 ng/ml dan limit deteksi <0.5 ng/ml.

### Analisa Statistik

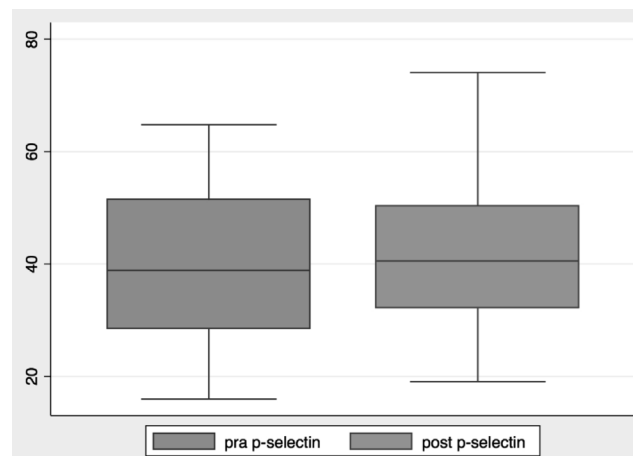
Analisa statistik dilakukan untuk menilai hubungan fungsi atrium kiri/IVAK dengan kadar P-selectin di atrium kiri. Data disajikan dalam bentuk mean ± simpangan deviasi atau median (minimal-maksimal) untuk data kontinu dan proporsi untuk data kategorik. Analisis deskriptif pada variable numerik dengan nilai mean, standar deviasi, nilai minimal, nilai maksimal. Deskripsi distribusi variable dilakukan dengan boxplot. Data kemudian diuji Saphiro Wilk untuk melihat normalitas distribusi data. Uji t-test berpasangan digunakan untuk variabel yang diukur 2 kali pra dan pasca KMTP. Kemudian dilakukan analisis regresi linier untuk melihat asosiasi antara variable bebas (IVAK) dengan variable terkait (P-selectin), dan analisis regresi linier multiple untuk melakukan *penyesuaian untuk* variable perancu. Batas kemaknaan  $p < 0.05$ . Analisa statistik menggunakan STATA 12.



**Gambar 2.** Boxplot MVA pra dan pasca KMTP



**Gambar 3.** Boxplot mMVG pra dan pasca KMTP



**Gambar 4.** Boxplot P-selectin pra dan pasca KMTP

## Hasil

Selama kurun waktu Mei 2013 sampai dengan Oktober 2013, terdapat 25 pasien SM sedang-berat yang menjalani KMTP di Pusat Jantung Nasional Harapan Kita Jakarta. Dari 25 pasien tersebut terdapat 20 pasien yang diikutsertakan dalam penelitian ini yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Dari 20 subyek yang diikutsertakan dalam penelitian ini, kebanyakan berjenis kelamin perempuan dan berusia <55 tahun. Distribusi irama jantung seimbang (50%) antara atrial fibrilasi dan irama sinus. Median tindakan KMTP dilakukan pukul 13.30 (9-20) WIB.

Dari ekokardiografi, didapatkan nilai rerata IVAK  $86.95 \pm 41.4$  ml/m<sup>2</sup>. Tidak ada nilai IVAK normal pada subyek. Sebagian besar subyek (80%) datang ke rumah sakit dengan MVA < 1 cm<sup>2</sup>. Nilai rerata mMVG pasien 10,95 mmHg dan skor Wilkin 7. Semua pasien memiliki atrium kiri yang melebar dengan nilai rerata diameter atrium kiri 48 mm. Semua pasien memiliki presentase fraksi ejeksi ventrikel kiri yang baik  $60,9 \pm 6,25$  %. (Tabel 1) Berdasarkan hasil tindakan KMTP dilakukan pengukuran MVA, mMVG dan P-selectin pra dan pasca tindakan. Nilai rerata MVA setelah tindakan meningkat menjadi  $1,56 \pm 0,5$  cm<sup>2</sup> (p=0.010), mMVG menurun menjadi  $6,15 \pm 1,79$  mmHg (p=0.012) dan P-selectin meningkat sedikit  $41,1 \pm 13,7$  (p=0.816). Data hasil tindakan KMTP dapat dilihat pada tabel 2.

Distribusi peningkatan MVA pra dan pasca KMTP digambarkan pada gambar grafik boxplot 2. Nilai rerata MVA setelah tindakan meningkat dari  $0,6 \pm 0,28$  menjadi  $1,56 \pm 0,5$  cm<sup>2</sup> (p=0.010). Distribusi peningkatan

P-selectin pra dan pasca KMTP digambarkan pada gambar grafik boxplot 5.4. Nilai rerata P-selectin tidak berbeda bermakna dari  $39,9 \pm 13,1$  menjadi  $41,1 \pm 13,7$  (p=0.816). Tidak ada asosiasi antara IVAK dengan kadar P-selectin pra dan pasca KMTP, walaupun sudah dilakukan penyesuaian (*adjusted*) terhadap variabel perancu yaitu usia, jenis kelamin, fibrilasi atrial (tabel 3).

## Pembahasan

Penelitian ini menunjukkan tidak terdapatnya hubungan antara fungsi atrium kiri yang sudah menurun dengan kadar P-selectin pra dan pasca KMTP walaupun terjadi perbaikan hemodinamik yang bermakna.

Hasil studi ini sejalan dengan penelitian sebelumnya dimana kadar P-selectin tidak menurun pasca KMTP. Chen dkk membuktikan kadar P-selectin pra dan pasca tindakan KMTP tidak menurun secara signifikan, namun dibanding kontrol orang normal kadar P-selectin tetap lebih tinggi karena adanya disfungsi endothelial yang persisten.<sup>17</sup>

Pada penelitian ini fungsi atrium kiri dinilai memakai IVAK. Nilai IVAK berhubungan dengan kejadian trombotik yaitu nilai IVAK yang makin tinggi akan meningkatkan kejadian trombotik.<sup>18,19</sup> Tetapi ternyata pada nilai IVAK yang >55 ml/m<sup>2</sup> penurunan risiko trombotik sebagai akibat perbaikan hemodinamik tidak berkaitan dengan kadar mediator inflamasi P-selectin. Adavane dkk. menunjukkan bahwa nilai IVAK dapat turun secara cepat pasca KMTP bila nilai IVAK awal <55 ml/m<sup>2</sup>.<sup>20</sup> Pada penelitian ini kadar P-selectin tidak

Tabel 2. Tabel rerata variabel pra dan pasca KMTP

Nama variabel	Pra KMTP (n=20)	Pasca KMTP (n=20)	Nilai p
MVA	$0,6 \pm 0,28$	$1,56 \pm 0,5$	0.010
mMVG	$15,96 \pm 5,43$	$6,15 \pm 1,79$	0.012
P-selectin	$39,9 \pm 13,1$	$41,1 \pm 13,7$	0.816

MVA= Mitral Valve Area, mMVG= mean Mitral Valve Gradient

Tabel 3. Tabel Asosiasi IVAK dengan kadar P-selectin

	IVAK Non Adjusted	IVAK Adjusted *
P-selectin pra KMTP	$\beta = -0.103$ (95% CI -0.251,0.045) p=0.16	$\beta = -0.154$ (95% CI -0.340,0.032) p=0.09
P-selectin pasca KMTP	$\beta = 0.009$ (95% CI -0.155,0.172) p=0.91	$\beta = -0.049$ (95% CI -0.250,0.152) p=0.61

\*Adjusted to sex, age, atrial fibrillation

CI= Confidence Interval, KMTP= Komisarotomi Mitral Transvena Perkutan,  $\beta$ = derajat asosiasi.

turun pasca KMTP mungkin karena nilai rerata IVAK >55 ml/m<sup>2</sup> sehingga perubahan kadar P-selectin tidak sejalan dengan perubahan nilai IVAK.

Kemungkinan lain yang dapat menjelaskan tidak didapatkan hubungan antara nilai IVAK dengan kadar P-selectin pra dan pasca KMTP adalah waktu pengambilan sampel darah subyek penelitian yang bervariasi (median pukul 13.30 WIB, dengan rentang waktu 09.00-20.00). Angleton dkk membuktikan bahwa kadar P-selectin pagi hari lebih tinggi dari malam hari.<sup>21</sup> Oleh karena itu Chen dkk mengambil subyek secara seragam pada pukul 09.00 dan 10.00 WIB untuk menghindari variasi diurnal.<sup>17</sup> Pada penelitian kami tidak mungkin dilakukan penyeragaman waktu pengambilan sampel dikarenakan keterbatasan jumlah ruang kateterisasi terhadap jumlah pasien sehingga urutan pengerjaan KMTP tidak bisa selalu pada waktu yang sama.

Penelitian ini untuk pertama kali menunjukkan hubungan antara IVAK dengan kadar P-selectin. Berbagai penelitian sebelumnya telah meneliti hubungan antara P-selectin dengan derajat severitas SM, penurunan kadar P-selectin pasca KMTP, perbandingan kadar P-selectin di atrium kiri dengan di perifer, kadar P-selectin pada fibrilasi atrium, kadar P-selectin berdasarkan jenis kelamin, kadar P-selectin berdasarkan usia.<sup>11,17, 22,23,24</sup>

Kovacs dkk menunjukkan tidak ada hubungan antara status koagulasi dengan aktivasi platelet P-selectin. Warfarin memiliki potensi efek lambat yang bervariasi pada tiap individu. Oleh karena itu mereka menyarankan untuk dilakukan monitor terhadap fungsi platelet pada tiap individu yang mendapat warfarin untuk menghindari risiko perdarahan dan memaksimalkan efek terapi.<sup>25</sup>

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah potensi efek lambat dari aktivitas platelet warfarin belum dapat disingkirkan seluruhnya walaupun pemberian anti koagulan atau warfarin telah dihentikan pada subyek selama 3 hari.<sup>25,26</sup> Demikian juga waktu pengambilan sampel P-selectin yang bervariasi saat dilakukan KMTP sehingga variasi diurnal kadar P-selectin masih dapat terjadi.<sup>27</sup>

## Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa tidak ada perbedaan nilai P-selectin pra dan pasca KMTP. Pada nilai IVAK yang sudah jelek tidak ada hubungan dengan kadar P-selectin pada pasien SM pra dan pasca KMTP. Diperlukan penelitian kohort prospektif jangka panjang untuk menilai perubahan IVAK dalam kaitannya dengan perubahan kadar P-selectin pasca KMTP.

## Daftar Pustaka

1. Chandrashekhar Y, Westaby S, Narula J. Mitral stenosis. *Lancet*. 2009 Oct 10;374(9697):1271-83.
2. Keren G, Etzion T, Sherez J, et al. Atrial fibrillation and atrial enlargement in patients with mitral stenosis. *Am Heart J* 1987; 114: 1146-55.
3. Mohr JP, Albers GW, Amarenco P, et al. Etiology of stroke. *Stroke J*. 1997;28:1501-1506.
4. Blume GG, McLeod CJ, Barnes ME, Seward JB, Pellikka PA, Bastiansen PM, et al. Left atrial function: physiology, assessment, and clinical implications. *Eur J Echocardiogr*. 2011 Jun;12(6):421-30.
5. Beswilan J, Cuyco RE, Tucay ES, Flores BV, Santos RJ, et al. Left Atrial Volume Index (LAVI) is a predictor of Exercise Functional Capacity in Patients with Rheumatic Mitral Stenosis. *Phil Heart Center*. 2008; 14(1): 14-19.
6. Stefano, G, Zhao H, Schulcler M, Hoit BD. Assesment of echocardiographic left atrial size: accuracy of M- mode and two dimensional methods and prediction of diastolic dysfunction. *Echocardiography*. 2012 Apr;29 (4); 379-84.
7. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, et al; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiography*. 2005;18:1440 -1463.
8. Libby P and Simon DL. Inflammation and Thrombosis: The Clot Thickens. *Circulation*. 2001;103:1718-1720.
9. Zimmerman GA, Presscot SM, and McIntyre TM. Endothelial Interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunology Today*. 1992. 13(3): 93-98.
10. Ritchie JL, Alexander HD, Rea IM. Flow cytometry analysis of platelet P selectin expression in whole blood-methodological considerations. *Clin Lab Haematol* 2000; 22:359-363.
11. Chen MC, Wu CJ, Yip HK, Chang HW, Fang CY, Yu TH, Fu M. Left atrial platelet activity with rheumatic mitral stenosis: correlation study of severity and platelet P-selectin expression by flow cytometry. 2003. Nov;124(5):1663-9.
12. Carabello BA. Modern management of Mitral stenosis. *Circulation*. 2005;112:432-437.
13. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, et al; Guidelines and Standards Echocardiographic Assessment of Valve Stenosis: EAE/ASE Recommendations for Clinical Practice. *European Journal of Echocardiography*. 2009;10:1-25.

14. Remenyi B, Wilson N, Steer A, et al. World Heart Federation criteria for echocardiographic diagnosis of rheumatic heart disease an evidence-based guideline WHO. Macmillan. 2012 May 9; 297-309.
15. Nobuyoshi M, Takeshi A, Shirai S, Hamasaki N, Yokoi H. Percutaneous Balloon Mitral Valvuloplasty: A Review. *Circulation*. 2009;119:211-219.
16. Patel DA, Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO, M. Left Atrial Volume Index Predictive of Mortality Independent of Left Ventricular Geometry in a Large Clinical Cohort With Preserved Ejection Fraction. *Mayo Clin Proc*. August 2011;86(8):730-737.
17. Chen MC, Chang HW, Juang SS, Yip HK, Wu CJ. Increased Plasma Levels of Soluble P-Selectin in Rheumatic Mitral Stenosis. 2004. July;(126):1: 54-58.
18. Shaikh Q, Ahmed B, Ahmed M, et al. Left atrial volumes and associated stroke subtypes. *BMC Neurology*. 2013;13:14.
19. Avirala S, Kumar S, O`Sullivan DM, et al. Echocardiographic predictors of left atrial appendage thrombus formation. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2011 May; 24 (5): 499-505.
20. Adavane S, Santhosh S, Karthikeyen S, Balachander J, et al. Decrease in left atrium volume after successful balloon mitral valvuloplasty: an echocardiographic and hemodynamic study. *Echocardiography*. 2011 Feb; 28 (2):154-60.
21. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989; 79:101-106.
22. Barbaux SC, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Francomme C, et al. Association Between P-Selectin Gene Polymorphisms and Soluble P-Selectin Levels and Their Relation to Coronary Artery Disease. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2001;21:1668-1673.
23. Ponthieux A, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, et al. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. 2004 Feb;172(2):299-308.
24. Goetta A, Ittenson A, Hoffmanns P, et al. Increased expression of P-selectin in patients with chronic atrial fibrillation. *Pacing ClinElectrophysiol*. 2000 Nov; 23:1872-5.
25. Kovacs IB, Murphy M, Barin E, et al. Effect of warfarin on arterial thrombogenesis: problems on monitoring. *Am J Hematol* 1993; 42:322-327.
26. Mieszczak C, Winther K. Does warfarin enhance platelet activity? *Eur J ClinPharmacol* 1996; 84:285-287.
27. Pachos GK and Fitzgerald G. Circadian Clocks and Vascular Function. *Circ Res*. 2010; 106:833-841.