

**lek. Karolina Gumiężna**

**Fracja niedojrzałych płytek krwi oraz płytkowe mikroRNA  
w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe  
w ostrych zespołach wieńcowych:  
prospektywne badanie kohortowe**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Mariusz Tomaniak

I Katedra i Klinika Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024 r.

Karolina Gumiężna  
3980879

dr hab. n. med. Mariusz Tomaniak  
Specjalista Kardiolog  
2982707

Słowa kluczowe: frakcja niedojrzałych płytek krwi, mikroRNA, monitorowanie leczenia przeciwplateletowego, niedojrzałe płytki krwi, ostry zespół wieńcowy, podwójna terapia przeciwplateletowa, reaktywność płytek krwi

Key words: acute coronary syndrome, antiplatelet therapy monitoring, dual antiplatelet therapy, immature platelet fraction, microRNA, platelet reactivity, reticulated platelets

Nazwa i numer projektu badawczego: Multimarker Evaluation of Platelet Activity and Aggregation in Patients Presenting with Acute Coronary Syndrome: Prospective Observational Study (MULTIMARKER-ACS), NCT06177587



*Pracę dedykuję Mamie i Tacie*

## WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PRACĘ DOKTORSKĄ

1. Gumieźna Karolina, Bednarek Adrian, Sygitowicz Grażyna, Baruś Piotr, Wiśniewska Agnieszka, Klimczak-Tomaniak Dominika, Kochman Janusz, Opolski Grzegorz, Grabowski Marcin, Tomaniak Mariusz, “Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy”, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023;32(12):1465-1470; doi:10.17219/acem/177406

IF = 2.1, punkty MEiN: 140

2. Gumieźna Karolina, Bednarek Adrian, Sygitowicz Grażyna, Maciejak-Jastrzębska Agata, Baruś Piotr, Hunia Jaromir, Klimczak-Tomaniak Dominika, Kochman Janusz, Grabowski Marcin, Tomaniak Mariusz, “Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function.”, *Journal of Clinical Medicine*, 2023;13(1):63; doi:10.3390/jcm13010063|

IF = 3.9, punkty MEiN: 140

3. Gumieźna Karolina, Baruś Piotr, Sygitowicz Grażyna, Wiśniewska Agnieszka, Bednarek Adrian, Zabłocki Jakub, Piasecki Adam, Klimczak-Tomaniak Dominika, Kochman Janusz, Grabowski Marcin, Tomaniak Mariusz, “Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy.”, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2024;29: 10742484231202864; doi:10.1177/10742484231202864

IF = 2.6, punkty MEiN: 100

4. Gumieźna, Karolina, Baruś Piotr, Sygitowicz Grażyna, Wiśniewska Agnieszka, Ochijewicz Dorota, Pasierb Karolina, Klimczak-Tomaniak Dominika, Kuca-Warnawin Ewa, Kochman Janusz, Grabowski Marcin, Opolski Grzegorz, Tomaniak Mariusz, Filipiak Krzysztof, “Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring.” *Cardiology Journal*, 2023;30(5):817-824; doi:10.5603/CJ.a2023.0019

IF = 3.0, punkty MEiN: 100

**Sumaryczny IF: 11.6**

**Suma punktów MEiN: 480**

## SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych skrótów .....	7
2. Streszczenie w języku polskim .....	9
3. Streszczenie w języku angielskim .....	13
4. Wprowadzenie .....	16
4.1 Ostre zespoły wieńcowe – epidemiologia .....	16
4.2 Znaczenie płytek krwi w patofizjologii ostrych zespołów wieńcowych.....	17
4.3 Podstawy leczenia przeciwplateletowego – znaczenie indywidualizacji terapii .....	18
4.4 Frakcja niedojrzałych płytek krwi i jej znaczenie w dotychczasowych badaniach. Przedstawienie osiągnięć na tle dotychczasowego stanu wiedzy .....	19
4.5 Płytkowe mikroRNA i ich znaczenie w dotychczasowych badaniach. Uzasadnienie wyboru poszczególnych cząsteczek .....	21
4.6 Uzasadnienie wyboru tematu pracy i połączenia przedstawionych publikacji w cykl .....	23
5. Założenia i cel pracy .....	24
6. Kopie opublikowanych .....	26
6.1 Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy.....	27
6.2 Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function.....	34
6.3 Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy .....	46
6.4 Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring ..	55
7. Podsumowanie i wnioski .....	64
7.1 Podsumowanie wyników.....	64
7.2 Implikacje kliniczne i wyznaczenie dalszych kierunków badań.....	67
7.3 Ograniczenia wnioskowania.....	70
7.4 Wnioski .....	72
8. Opinia Komisji Bioetycznej.....	73

9. Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy.....	75
10. Źródła finansowania.....	116
11. Podziękowania .....	117
12. Piśmiennictwo.....	118

## **SPIS RYCIN**

1. Schemat ilustrujący zależność pomiędzy ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych i krwotocznych a stopniem zahamowania płytek krwi

## **SPIS TABEL**

1. Kryteria włączenia i wyłączenia

## 1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACS	ostry zespół wieńcowy (ang. <i>acute coronary syndrome</i> )
ASA	kwask acetylosalicylowy (ang. <i>acetylsalicylic acid</i> )
CVD	choroby sercowo-naczyniowe (ang. <i>cardiovascular diseases</i> )
DAPT	podwójna terapia przeciwplateletowa (ang. <i>dual antiplatelet therapy</i> )
DES	stent uwalnający lek (ang. <i>drug eluting stent</i> )
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. <i>European Society of Cardiology</i> )
HTPR	wysoka reaktywność płytek krwi podczas terapii (ang. <i>high on-treatment platelet reactivity</i> )
IPC	liczba niedojrzałych płytek krwi (ang. <i>immature platelet count</i> )
IPF	frakcja niedojrzałych płytek krwi (ang. <i>immature platelet fraction</i> )
LTA	agregometria oparta na transmisji światła widzialnego (ang. <i>light transmission aggregometry</i> )
MACE	poważne niekorzystne zdarzenia sercowo-naczyniowe (ang. <i>major adverse cardiovascular events</i> )
MEA	wieloelektrodowa agregometria impedancyjna (ang. <i>multiple electrode aggregometry</i> )
MI	zawał serca (ang. <i>myocardial infarction</i> )
MPV	średnia objętość płytki krwi (ang. <i>mean platelet volume</i> )
miR	mikroRNA (ang. <i>microRNA</i> )
NSTE-ACS	ostry zespół wieńcowy bez uniesienia odcinka ST (ang. <i>non-ST elevation acute coronary syndrome</i> )
NSTEMI	zawał serca bez uniesienia odcinka ST (ang. <i>non-ST elevation myocardial infarction</i> )

PCI	przezskórna interwencja wieńcowa (ang. <i>percutaneous coronary intervention</i> )
PFT	test oceny funkcji płytek krwi (ang. <i>platelet function test</i> )
RPs	niedojrzałe płytki krwi (ang. <i>reticulated platelets</i> )
STE-ACS	ostry zespół wieńcowy z uniesieniem odcinka ST (ang. <i>ST elevation acute coronary syndrome</i> )
STEMI	zawał serca z uniesieniem odcinka ST (ang. <i>ST elevation myocardial infarction</i> )
UA	niestabilna dławica piersiowa (ang. <i>unstable angina</i> )

## 2. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

**Wprowadzenie:** Ostre zespoły wieńcowe (*acute coronary syndromes*, ACS) stanowią poważny problem zdrowotny na całym świecie, zasługujący na szczególną uwagę. Jednym z kluczowych elementów patofizjologii ACS są płytki krwi. W związku z tym terapia skoncentrowana na inhibicję ich działania stanowi podstawę leczenia w tej grupie pacjentów. Pomimo postępów w rozumieniu fizjologii płytek krwi i rozwoju leków przeciwplatek, wciąż istnieje szereg luk w dowodach naukowych dotyczących optymalnego podejścia do czasu trwania i doboru leków w terapii przeciwplatekowej u pacjentów z ACS. Wobec zróżnicowanej odpowiedzi pacjentów na stosowane leczenie mające na celu zapobieganie powikłaniom zakrzepowo-zatorowym, jednocześnie wiążąc się z ryzykiem powikłań krwotocznych, podkreślana jest potrzeba indywidualizacji strategii leczenia. Obecne wytyczne Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (*European Society of Cardiology*, ESC) dostrzegają to wyzwanie, sugerując zastosowanie ogólnych skal oceny ryzyka wystąpienia zdarzeń zakrzepowo-zatorowych i krwotocznych. Aktualnie, rutynowa ocena funkcji płytek krwi nie jest rekomendowana u wszystkich pacjentów poddawanych przezskórnym interwencjom wieńcowym (*percutaneous coronary intervention*, PCI). Planując farmakoterapię można ją jednak rozważyć w zależności od profilu ryzyka i dostępności testów (zalecenie ESC klasy IIb, poziom dowodów naukowych A).

Prezentowana praca miała na celu ocenę roli dwóch obiecujących markerów – frakcji niedojrzałych płytek krwi (*immature platelet fraction*, IPF) i wybranych płytkopochodnych mikroRNA (*microRNA*, miR) – w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe w ACS. IPF jest jednym ze wskaźników używanych do reprezentacji ilości niedojrzałych płytek krwi (*reticulated platelets*, RPs) i wyraża ich odsetek w całej populacji płytek krwi w procentach. Ze względu na większą reaktywność RPs, podejrzewa się, że IPF może być użyteczna w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego i monitorowaniu terapii przeciwplatekowej. Wgląd w interakcję pomiędzy IPF a terapią przeciwplatekową może stworzyć szansę na udoskonalenie strategii leczenia i poprawę jego wyników u pacjentów z ACS. MiR to krótkie, niekodujące cząsteczki RNA, które odgrywają kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji genów. MiR pochodzące z płytek krwi mogą regulować procesy ich aktywacji i tym samym wpływać na odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe. Analiza wybranych płytkopochodnych miR wśród pacjentów z ACS może pozwolić na lepsze zrozumienie ich roli w patomechanizmie zespołów wieńcowych, a także ocenić ich

przydatność jako potencjalnych nowych biomarkerów do stratyfikacji ryzyka i monitorowania skuteczności podwójnej terapii przeciwplateletowej (*dual antiplatelet therapy*, DAPT).

**Cel:** Głównym celem pracy była analiza roli IPF i płytkowych miR w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatetowe w ACS.

**Metody:** Badanie zostało zarejestrowane w ClinicalTrials.gov (NCT06177587). Część oryginalną pracy doktorskiej stanowiło prospektywne jednośrodkowe badanie kohortowe, do którego włączani byli pacjenci przyjmowani do I Kliniki Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z rozpoznaniem ACS (Publikacje 1-3). Pacjenci poddawani byli koronarografii i PCI zgodnie z obowiązującymi wytycznymi postępowania. W okresie okołozabiegowym chorzy otrzymywali dawki nasycające leków przeciwplatetowych, obejmujące kwas acetylosalicylowy oraz antagonistę receptora P2Y<sub>12</sub> - kłopidogrel lub tikagrelor. Próbkę krwi z żyły obwodowej pobierano w ciągu pierwszych 24 godzin po zabiegu. Analizę IPF przeprowadzono na krwi pełnej antykoagulowanej kwasem etylenodiaminotetraoctowym (K3EDTA) przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego (Sysmex XN 2000, Kobe, Japonia). Agregometrię impedancyjną z ADP jako agonistą, przeprowadzono 30-120 minut po pobraniu krwi przy wykorzystaniu analizatora Multiplate® (Roche Diagnostics, Bazylea, Szwajcaria). Badanie agregacji przeprowadzono zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta. Pacjenci byli następnie obserwowani przez okres 60 miesięcy w celu oceny długoterminowych wyników leczenia i wartości prognostycznej badanych parametrów (Publikacje 1 i 3). Pierwszorzędowy punkt końcowy zdefiniowano jako poważne niekorzystne zdarzenia sercowo-naczyniowe (*major adverse cardiovascular events*, MACE) obejmujące zgon, zawał mięśnia sercowego (*myocardial infarction*, MI), udar mózgu i nieplanowaną rewaskularyzację. Poszerzenie analiz dotyczące oceny miR zostało przeprowadzone w podgrupie pacjentów z ACS, obejmującej dodatkowo pacjentów leczonych prasugrelem i zdrowych ochotników (Publikacja 2). Oznaczenia miR wykonywane były z próbek krwi żyłnej, pobranej w ciągu pierwszych 24 godzin po zabiegu. Pacjenci otrzymywali DAPT z użyciem kłopidogrelu, tikagreloru lub prasugrelu jako antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub>. W publikacji przedstawiono szczegółowe metody pomiaru ekspresji wybranych miR: miR-126-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-197-3p i miR-24-3p.

Część poglądową rozprawy doktorskiej stanowi kompleksowy przegląd dostępnego piśmiennictwa (Publikacja 4).



**Wyniki:** Do pierwszej części badania włączono 140 pacjentów (Publikacje 1 i 3). Pełna obserwacja klinicznych punktów końcowych była dostępna dla 130 chorych. Łącznie MACE wystąpiły u 27 pacjentów (20,8%) w okresie obserwacji o medianie wynoszącej 57 miesięcy. Po podzieleniu pacjentów na tercyle w oparciu wartość IPF, model proporcjonalnego hazardu Coxa wykazał istotną różnicę w występowaniu MACE w najwyższym tercylu, w porównaniu z najniższym tercylem IPF (HR = 5,341 95% CI: 1,546-18,454, p = 0,008). Wieloczynnikowa analiza regresji Coxa ujawniła, że wyjściowy poziom IPF był niezależnie związany z przyszłym wystąpieniem MACE (HR = 1,279, 95% CI: 1,056-1,549, p = 0,012). Analiza krzywej ROC (*Receiver operating characteristic*) pozwoliła uzyskać pole pod krzywą (*area under curve*, AUC) na poziomie 0,656 dla 5-letnich wyników z punktem odcięcia IPF wynoszącym 3,45%, który był w 63,0% czuły i w 65,0% swoisty dla MACE. Analiza wykazała również, że odsetek IPF koreluje z reaktywnością płytek krwi indukowaną ADP u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez uniesienia odcinka ST (*non-ST elevation acute coronary syndrome*, NSTEMI-ACS) (rho = 0,387, 95% CI: 0,101-0,615, p = 0,008), niezależnie od otrzymywanego antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub>, ale nie zaobserwowano tej zależności w grupie osób z ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem odcinka ST (*ST elevation acute coronary syndrome*, STEMI-ACS) (Publikacja 1). Podobną, jeszcze silniejszą zależność zaobserwowano dla liczby niedojrzałych płytek krwi (*immature platelet count*, IPC). Do drugiej części badania (Publikacja 2), dotyczącej pomiarów miR, zrekrutowano 97 pacjentów, w tym 79 osób z ACS i 18 zdrowych ochotników. Badanie potwierdziło istotnie niższą ekspresję miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p i miR-197-3p u pacjentów leczonych tikagrelorom w porównaniu z kłopidogrelem (fold change od -1,43 do -1,27, wartości p od 0,028 do 0,048). Zaobserwowano pozytywne korelacje między reaktywnością płytek krwi a ekspresją miR-223-3p (rho = 0,400, p = 0,019) i miR-21-5p (rho = 0,423, p = 0,013) u pacjentów leczonych silnymi antagonistami receptora P2Y<sub>12</sub> (tikagrelorom lub prasugrelem).

### **Wnioski:**

- Zróżnicowana odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne wskazuje na konieczność spersonalizowanych strategii leczenia oraz poszukiwania nowych biomarkerów do optymalizacji i monitorowania terapii.
- Wartość IPF u pacjentów z NSTEMI-ACS przyjmujących DAPT koreluje z wynikiem agregometrii impedancyjnej indukowanej ADP.

- Ekspresja miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p istotnie różni się między pacjentami otrzymującymi silne (tikagrelor) oraz słabsze (klopidogrel) leki z grupy antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> w ramach DAPT, a ponadto ekspresja miR-223-3p i miR-21-5p koreluje z wynikiem agregometrii impedancyjnej.
- IPF u pacjentów z ACS ma znaczącą wartość predykcyjną dla MACE w obserwacji długoterminowej. Jednocześnie czułość i swoistość IPF wydaje się na ten moment zbyt niska, aby mogła służyć jako samodzielne narzędzie do podejmowania decyzji terapeutycznych.
- Uzasadnione są dalsze badania nad wykorzystaniem IPF oraz wybranych płytkowych miR w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne w ACS.

### 3. STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)

**Title:** Immature platelet fraction and platelet microRNAs in the assessment of prognosis and response to antiplatelet therapy in acute coronary syndromes: a prospective cohort study

**Background:** Acute coronary syndromes (ACS) are a major public health concern worldwide. Platelets play a central role in the pathophysiology of ACS, and antiplatelet therapy is a cornerstone of its management. Despite advances in the understanding of platelet biology and the development of antiplatelet agents, a notable gap in evidence regarding the optimal approach to antiplatelet therapy in ACS patients exists. The need for individualization of treatment strategies is underscored by the heterogeneity of patient responses and different risks of adverse outcomes. While current guidelines acknowledge this challenge, they predominantly rely on general risk scores that assess bleeding and ischemic risks, lacking factors for predicting platelet reactivity due to the absence of suitable biomarkers. The presented work aims to bridge this gap by investigating the role of two promising factors – immature platelet fraction (IPF) and selected platelet microRNAs (miRs) – in the assessment of the prognosis and response to antiplatelet therapy in ACS. IPF reflects the number of newly released platelets into circulation. Due to the greater activity of young platelets, it is suspected that IPF may be useful in assessing cardiovascular risk and monitoring antiplatelet therapy. Insights into the interplay between IPF and antiplatelet therapy offer promise for refining treatment strategies and improving outcomes in ACS patients. MiRs, small RNA molecules, play crucial roles in post-transcriptional gene regulation and contribute to cardiovascular diseases' development, including ACS. Specific platelet-derived miRs can regulate platelets' activation processes and thus affect the response to antiplatelet therapy. Exploring the role of selected platelet miRNAs holds promise for improvement of our understanding of ACS mechanisms and their utility as novel, minimally invasive biomarkers for risk stratification and monitoring dual antiplatelet therapy (DAPT).

**Aim:** The main objective of the work was to evaluate the roles of IPF and platelet miRs in assessing patients' prognosis and response to antiplatelet therapy in ACS.

**Methods:** The study was registered with ClinicalTrials.gov (NCT06177587). In the prospective phase of the study, adult patients with ACS upon admission were enrolled in the First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw (Publications 1-3). Participants underwent coronary angiography, with percutaneous coronary intervention (PCI) performed as

per current guidelines. Periprocedurally, patients received loading doses of antiplatelet agents including clopidogrel or ticagrelor as P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. Peripheral vein blood samples were obtained within the first 24 hours post-procedure. IPF analysis was conducted on whole blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (K3EDTA) using an automated hematological analyzer (Sysmex XN 2000, Kobe, Japan). Impedance aggregometry with adenosine diphosphate (ADP) as an agonist, was performed 30–120 minutes after blood sampling with the Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The aggregation test was conducted following the manufacturer's instructions. Patients were subsequently followed for a period of 60 months to assess long-term outcomes and evaluate the prognostic value of the studied parameters (Publications 1 and 3). The primary endpoint was defined as major adverse cardiovascular events (MACE) comprising all-cause mortality, myocardial infarction (MI), stroke, and unplanned revascularization. The extension regarding miR assessment was performed in the subset of enrolled ACS population, which was expanded to include 18 prasugrel-treated patients and 18 healthy volunteers (Publication 2). Blood sampling for miR expression measurements was performed in the first 24 hours after the procedure. Patients received DAPT including clopidogrel, ticagrelor, or prasugrel as a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. The manuscript provides detailed methods regarding the measurement of the expression of selected miRs: miR-126-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-197-3p, and miR-24-3p. The final part includes a comprehensive review of the pertinent literature (Publication 4).

**Results:** 140 patients were included in the first part of the study (Publications 1 and 3). Complete clinical follow-up was available for 130 of them. Overall MACE occurred in 27 patients (20.8%) in the median follow-up time of 57 months. After dividing patients into tertiles based on IPF level, Cox proportional hazard model for MACE revealed a significant difference in the occurrence of MACE in the highest compared to the lowest tertile (HR = 5.341 95% CI: 1.546-18.454, p = 0.008). Multivariable Cox regression analyses showed that baseline IPF level was independently associated with MACE (HR = 1.279, 95% CI: 1.056-1.549, p = 0.012). Time-dependent receiver operating characteristic (ROC) curve analysis revealed area under curve (AUC) of 0.656 for 5-year outcome with an IPF cut point of 3.45% being 63.0% sensitive and 65.0% specific for MACE. The analysis also revealed that the level of IPF correlates with ADP-induced platelet reactivity in non-ST elevation acute coronary syndrome (NSTE-ACS) patients (rho = 0.387, 95% 95% CI: 0.101–0.615, p = 0.008), independently of the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist received, but was not observed in the ST

elevation acute coronary syndrome (STE-ACS) group (Publication 1). A similar, even stronger relationship was observed for immature platelet count (IPC). The second part of the study (Publication 2), regarding miR measurements recruited 97 patients, including 79 ACS individuals and 18 healthy volunteers. It revealed significantly lower expression of miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, and miR-197-3p in patients treated with ticagrelor compared to clopidogrel (fold changes from -1.43 to -1.27, p-values from 0.028 to 0.048). Positive correlations were observed between platelet reactivity and the expression of miR-223-3p ( $\rho = 0.400$ ,  $p = 0.019$ ) and miR-21-5p ( $\rho = 0.423$ ,  $p = 0.013$ ) in patients treated with potent drugs.

### **Conclusions:**

- The heterogenic response to antiplatelet therapy highlights the necessity for personalized treatment strategies, with the incorporation of new biomarkers offering the potential to enhance personalized management.
- The value of IPF in NSTEMI-ACS patients correlates with ADP-induced platelet reactivity assessed with impedance aggregometry.
- The expression of miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p significantly differs between patients receiving potent (ticagrelor) and less potent (clopidogrel) P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists as part of DAPT; in addition, the expression of miR-223-3p and miR-21-5p correlates with the impedance aggregometry results.
- IPF measurements in ACS patients have predictive value for long-term MACE, however their sensitivity and specificity at this point appear insufficient as an independent tool for therapeutic decision-making.
- Further research on the utility of IPF and selected platelet miRs as prognostic tools of MACE and response to DAPT in ACS is warranted.

## 4. WPROWADZENIE

### 4.1 Ostre zespoły wieńcowe – epidemiologia

Choroby sercowo-naczyniowe (*cardiovascular diseases, CVD*) stanowią główną przyczynę zgonów zarówno w Europie, jak i na świecie [1]. Choroba niedokrwienności serca jest najczęstszą manifestacją CVD i odpowiada za 17% wszystkich zgonów w 57 krajach członkowskich Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (*European Society of Cardiology, ESC*) [2]. Dane Narodowego Funduszu Zdrowia wskazują, że występowanie ostrych zespołów wieńcowych (*acute coronary syndromes, ACS*) w Polsce w latach 2014-2021 wahało się w granicach 80 tys.-130 tys. przypadków rocznie [3]. Istotnym problemem, zarówno w przypadku niestabilnej dławicy piersiowej (*unstable angina, UA*) jak i zawału serca (*myocardial infarction, MI*) pozostaje nie tylko wczesna śmiertelność (do 30 dni od incydentu), ale także wyniki długoterminowe. Choć możliwości terapeutyczne poprawiły się istotnie w ostatnich dekadach, co ma swoje pozytywne przełożenie na długość przeżycia, to wciąż rokowanie długoterminowe chorych po ACS jest istotnie gorsze niż w porównywalnej populacji osób bez incydentów wieńcowych w wywiadzie [4]. Mimo kluczowej roli leczenia ostrej fazy choroby, statystyki podkreślają duże znaczenie optymalnej terapii również w odległej perspektywie po incydencie.

## 4.2 Znaczenie płytek krwi w patofizjologii ostrych zespołów wieńcowych

Pierwsze opisy dotyczące płytek krwi pojawiły się w XIX wieku [5], jednak dopiero w drugiej połowie XX wieku zaczęto doceniać ich rolę w patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego, w szczególności choroby wieńcowej [6]. Obecnie wiemy, że ich znaczenie zarówno w przewlekłych procesach, tj. progresja blaszki miażdżycowej, jak i w ostrych stanach tj. ACS jest kluczowe [7].

Jednym z podstawowych mechanizmów, w których dochodzi do wystąpienia ACS jest tworzenie się czopu płytkowego w tętnicy wieńcowej w odpowiedzi na pęknięcie lub erozję blaszki miażdżycowej [8]. Czynniki tkankowy, produkowany przez makrofagi zawarte w pękniętej blaszce, stymuluje adhezję płytek krwi do uszkodzonego miejsca w ścianie tętnicy wieńcowej, prowadząc następnie do ich aktywacji i agregacji. Istotne znaczenie w procesie miażdżycowym mają również inne komórki układu immunologicznego, za którego modulację odpowiadają liczne czynniki zawarte w ziarnistościach płytkowych [9]. Ponadto, uszkodzenia śródbłonna zaburzą produkcję czynników przeciwplatekcyjnych i rozszerzających naczynia, tj. tlenek azotu czy prostacykliny, a aktywowane płytki wydzielają kolejne cytokiny i inne mediatory nasilające aktywację coraz większej liczby płytek, ich agregację oraz zwężenie naczynia. Powstający skrzep ogranicza światło tętnicy istotnie redukując przepływ krwi, prowadząc do niedokrwienia, a następnie martwicy mięśnia sercowego.

### 4.3 Podstawy leczenia przeciwplatekowego – znaczenie indywidualizacji terapii

Ze względu na opisane powyżej patomechanizmy, podstawą leczenia zarówno ostrej fazy zespołu wieńcowego, jak i długoterminowej prewencji wtórnej po ACS jest optymalna terapia skoncentrowana na inhibicję działania płytek krwi. Obecnie w jej skład wchodzi standardowo kwas acetylosalicylowy (*acetylsalicylic acid*, ASA) oraz antagonistą receptora P2Y<sub>12</sub>, przy czym po pewnym czasie (jeśli nie istnieją dodatkowe czynniki ryzyka to zgodnie z wytycznymi ESC czas ten powinien wynosić 12 miesięcy) podwójna terapia przeciwplatekowa (*dual antiplatelet therapy*, DAPT) zastępowana jest monoterapią jednym z powyższych leków [10]. Niestety, zmienność osobnicza w wyjściowej aktywności płytkowej, a także różnorodna, zależna między innymi od czynników genetycznych determinujących polimorfizmy enzymów wątrobowych odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe, prowadzą do występowania wysokiej reaktywności płytek krwi podczas terapii (*high on-treatment platelet reactivity*, HTPR), dotyczącej nawet do 30% pacjentów leczonych kłopidogrelem, a także do 15% i do 3% osób leczonych odpowiednio tikagrelorem i prasugrelem [11]. Jest to stan predysponujący do kolejnych zdarzeń niedokrwienych, a jego identyfikacja powinna skłonić do rozważenia bardziej intensywnej – dłuższej lub silniejszej terapii przeciwplatekowej [12, 13, 14]. W świetle aktualnych wytycznych ESC, planując farmakoterapię, wykonanie dodatkowych testów odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe celem ewentualnej modyfikacji terapii można rozważyć u pacjentów ze szczególnym profilem ryzyka i w zależności od dostępności odpowiednich narzędzi (klasa zaleceń IIb, poziom dowodu naukowego A) [10, 15]. Wytyczne zwracają jednak uwagę na obecność luk w dowodach naukowych w tym zakresie i konieczność prospektywnej oceny takiej strategii [10, 15].

Z drugiej strony, mimo niewątpliwych zalet leczenia przeciwplatekowego, wiąże się ono ze zwiększonym ryzykiem zdarzeń krwotocznych, które, jak wykazano, mają niekorzystne znaczenie rokownicze [16]. Obecnie, coraz częściej obiera się zatem kurs na indywidualizację terapii z uwzględnieniem klinicznych czynników ryzyka zdarzeń niedokrwienych i krwotocznych, wykorzystując pomiar wyjściowej reaktywności płytek krwi i jego potencjalny związek z odpowiedzią na leczenie.



#### **4.4 Frakcja niedojrzałych płytek krwi i jej znaczenie w dotychczasowych badaniach. Przedstawienie osiągnięć na tle dotychczasowego stanu wiedzy**

Płytki krwi krążą we krwi obwodowej przez 7-10 dni. Mimo, że czas ten jest relatywnie niedługi, możemy podzielić ich „życie” na różne etapy, najogólniej wyróżniając niedojrzałe i dojrzałe płytki krwi. Najmłodsze, świeżo uwolnione do krążenia niedojrzałe płytki krwi (*reticulated platelets*, RPs) są zwykle większe i zawierają matrycowy RNA (*messenger RNA*, mRNA) [17].

Frakcja niedojrzałych płytek (*immature platelet fraction*, IPF) jest jednym ze wskaźników używanych do reprezentacji ich ilości. Wyraża ona odsetek RPs w całkowitej populacji krążących płytek przedstawiony w procentach. Pozwala także na obliczenie bezwzględnej liczby niedojrzałych płytek krwi (*immature platelet count*, IPC) jako iloczynu IPF i całkowitej liczby płytek krwi. Podwyższona IPF pojawia się w sytuacji zwiększonej produkcji RPs przez megakariocyty w szpiku kostnym i jest wskaźnikiem wysokiego obrotu płytkowego (*platelet turnover*). Wykazano, że RPs są bardziej reaktywne niż dojrzałe płytki, co przekłada się na ich istotną rolę w procesach krzepnięcia, a także w występowaniu ACS [18]. Podejrzewa się, że IPF może być parametrem korelującym z reaktywnością płytek krwi, co u pacjentów z ACS mogłoby istotnie pomóc ocenić odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe, wraz z możliwością jego planowania, monitorowania lub optymalizacji w oparciu o ten parametr.

Przedstawiona praca jest jedną z pierwszych prób porównania wyników klinicznych w zależności od wyjściowej wartości IPF w długoterminowej obserwacji u pacjentów z ACS leczonych standardową DAPT. Dotychczas wykazano istnienie takiej zależności w krótszej obserwacji [19, 20]. Jedną z hipotez uzasadniających opisaną zależność jest wspomniana już wcześniej korelacja między poziomem IPF a reaktywnością płytek. W przedstawionym w pracy badaniu podjęłam się weryfikacji hipotezy, według której istnieje związek pomiędzy IPF a skutecznością stosowanych leków przeciwplatekowych z grupy antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub>. W tym celu, obok nowych potencjalnych biomarkerów oceniałam reaktywność płytek za pomocą wystandaryzowanej metody – wieloelektrodowej agregometrii impedancyjnej (*multiple electrode aggregometry*, MEA). Dotychczasowe badania są w tym temacie niekonkluzywne [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31], co może wynikać między innymi ze znacznie odmiennych projektów tych badań – przede wszystkim różnych punktów czasowych, w których wykonywano pomiary, a także innych kryteriów włączenia i wyłączenia, w szczególności dotyczących klinicznej prezentacji choroby wieńcowej.

W przedstawionej pracy, w przeciwieństwie do poprzednich badaczy, przeanalizowałam oddzielnie grupy z różną prezentacją ACS, ponieważ fenotyp płytek krwi oraz średnia objętość płytki (*mean platelet volume*, MPV) mogą być zasadniczo różne u pacjentów z zawałem serca bez uniesienia odcinka ST (*non-ST elevation myocardial infarction*, NSTEMI) w porównaniu do osób z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (*ST elevation myocardial infarction*, STEMI) [32]. Co więcej, opisywano różną farmakokinetykę i farmakodynamikę niektórych antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> w zależności od rozpoznania klinicznego [33, 34]. Ponadto, w dotychczasowych pracach obejmujących pacjentów leczonych kłopidogrelem rekrutowano głównie osoby z przewlekłą chorobą wieńcową lub używano innych, mniej dokładnych testów do oceny odpowiedzi płytkowej na leczenie.

#### 4.5 Płytkowe mikroRNA i ich znaczenie w dotychczasowych badaniach. Uzasadnienie wyboru poszczególnych cząsteczek

MikroRNA (*microRNA*, miR) to krótkie (18-25 nukleotydów), niekodujące fragmenty RNA, których główną rolą jest regulacja ekspresji mRNA. Po raz pierwszy zidentyfikowano je w 1993 roku, a w chwili obecnej uważa się, że mogą brać udział w kontrolowaniu większości zachodzących w organizmie procesów [35, 36]. Ich istotną zaletą jest stabilność po uwolnieniu do krążenia, co przekłada się na możliwość dokładnych, powtarzalnych pomiarów [37]. Podobnie jak w przypadku innych związków zbudowanych z kwasów nukleinowych, istnieją metody umożliwiające ich skuteczną amplifikację, co pozwala na wykrywanie nawet niedużych ilości miR. Wykazano, że funkcja i aktywność płytek krwi jest również w dużej mierze regulowana przy pomocy tych niewielkich cząsteczek [36]. W samych płytkach krwi zidentyfikowano kilkaset różnych miR. W poniższej pracy zdecydowałam skupić się na tych, których znaczenie dla aktywacji płytek, występowania ACS oraz monitorowania leczenia przeciwplatekowego mogłoby być najistotniejsze w związku z czym wybrałam następujące cząsteczki: miR-223-3p, miR-126-3p, miR-21-5p, miR-197-3p i miR-24-3p. Wszystkie wybrane miR są obficie obecne w płytkach krwi [38].

MiR-223 to jedno z najdokładniej poznanych płytkowych miR. W płytkach krwi bierze udział w regulacji ekspresji receptora P2Y<sub>12</sub>, co przekłada się na ważną rolę w modyfikacji ich aktywności. MiR-223 wiąże się z regionem niepodlegającym translacji 3' mRNA *P2Y12*, hamując ekspresję tego genu [39]. Wstępne badania dotyczące tej cząsteczki wskazują, że istnieje związek między ekspresją miR-223, a występowaniem HTPR, a także, że może mieć ona znaczenie predykcyjne występowania poważnych niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych (*major adverse cardiovascular events*, MACE) u pacjentów z chorobą wieńcową [40]. Ponadto, miR-223 wykazuje wyższą ekspresję u pacjentów z chorobą wieńcową, niż u osób zdrowych, co przekłada się – zgodnie z poznany mechanizm działania – na obniżoną ekspresję genu receptora P2Y<sub>12</sub> [41]. W przypadku miR-126, jego rola w regulacji działania płytek jest bardziej wielopłaszczyznowa: cząsteczka ta również bierze udział w regulacji ekspresji receptora P2Y<sub>12</sub>, dodatkowo posiada jednak także zdolność regulacji białka ADAM9, wpływając na zahamowanie adhezji płytek krwi do kolagenu. Taki mechanizm działania sugeruje, że niższe wartości miR-126 mogą wiązać się ze słabszą aktywnością płytkową [42]. W badaniu przeprowadzonym na niewielkiej grupie pacjentów wykazano także, że jego poziom jest zależny od siły zahamowania płytek krwi [43]. Co więcej,

ekspresja miR-126 wykazywała pozytywny związek z występowaniem MI [44]. Znaczenie miR-197 dla odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe wydaje się nie mniej istotne. Dotychczas opisano jego rolę predykcyjną dla MI [44] oraz dla zgonów sercowo naczyniowych u pacjentów z chorobą wieńcową [40]. W badaniach nad celami działania miR-21 wykazano z kolei, że jego farmakologiczna inhibicja osłabia uwalnianie transformującego czynnika wzrostu (*transforming growth factor*, TGF)  $\beta$ 1 i innych pozakrzepowych czynników z płytek krwi [45]; zaobserwowano także jego podwyższoną ekspresję u pacjentów z MI, która dobrze korelowała z markerami ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego [46]. Ostatnią badaną cząsteczką było miR-24. Kilukrotnie opisywano jej związek z terapią przeciwplatekową, zwracając uwagę między innymi na pozytywną korelację ekspresji miR-24 z opornością na leczenie klopidoogrelem [47]. Co również istotne dla przedstawionych badań, w kontekście pacjentów z ACS zaobserwowano korelację między aktywnością płytek krwi ocenianą z użyciem testu VASP (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein), a miR-24, miR-223 i miR-126 [42]. Ta zależność była nieobecna przy zastosowaniu agregometrii opartej na transmisji światła widzialnego (*light transmission* agregometry, LTA). W przedstawionej poniżej pracy w celu oceny reaktywności płytek użyto MEA, czyli metody, którą charakteryzuje szereg zalet nad powyższymi. Ze względu na prostsze wykonanie (krótszy czas i mniejszą objętość potrzebnej krwi), brak konieczności obróbki próbki, a także wystandaryzowaną metodologię, MEA może dawać bardziej wiarygodne wyniki niż inne testy oceny funkcji płytek (*platelet function test*, PFT) [48]. W porównaniu większości dostępnych PFT użytecznych w ocenie odpowiedzi na DAPT, Multiplate<sup>®</sup> (wykorzystujący MEA) charakteryzował się jedną z najlepszych (lecz wciąż pozostawiającą obszar do poprawy) powtarzalnością uzyskiwanych pomiarów [49].

Wszystkie badane cząsteczki wymieniane są jako potencjalne markery terapii przeciwplatekowej jednak konsensus, który z nich byłby najlepszym wyborem w tym celu nie został jeszcze osiągnięty [50].

#### **4.6 Uzasadnienie wyboru tematu pracy i połączenia przedstawionych publikacji w cykl**

Publikacje 1, 2 i 3 podsumowują analizy wykonane w ramach prospektywnego badania pt. “Multimarker Evaluation of Platelet Activity and Aggregation in Patients Presenting With Acute Coronary Syndrome: Prospective Observational Study” (ClinicalTrials.gov: NCT06177587).

Badania oryginalne opublikowane jako Publikacje 1 i 3 przedstawiają wartość diagnostyczną i prognostyczną IPF lub IPC u pacjentów z ACS. Obie te prace stanowią część większego projektu badawczego, uzupełniając się, a także pozwalając na wysnuwanie kolejnych hipotez tłumaczących wzajemnie otrzymane wyniki. Obie prezentowane prace poszerzają wiedzę dotyczącą wpływu IPF zarówno na wyjściowe ryzyko sercowo-naczyniowe, jak i na odpowiedź na leczenie u pacjentów z ACS, poszerzając obszar do indywidualnej optymalizacji strategii terapeutycznych w tej populacji. Pacjenci do obu części badania (Publikacja 1 i 3) rekrutowani byli zgodnie ze wspólnymi kryteriami włączenia i wyłączenia wskazanymi w tych pracach. Kolejne analizy (Publikacja 2) uzupełniają te ustalenia, badając wpływ DAPT na wybrane miR płytek krwi. Podczas gdy pierwsze dwie publikacje określają prognostyczną i predykcyjną rolę IPF, trzecia bada ekspresję miR związanych z płytkami krwi w ACS. Wspólne spostrzeżenia z tych trzech badań stanowią zatem podstawę dla bardziej holistycznego zrozumienia złożonej interakcji między IPF, funkcją płytek krwi i odpowiedziami terapeutycznymi, oferując cenne perspektywy dla spersonalizowanych strategii terapeutycznych u pacjentów z ACS.

Publikacja 4 przedstawia dotychczasowy stan wiedzy na temat badanych parametrów dotyczących niedojrzałych płytek krwi, przede wszystkim IPF i IPC, w szczególności skupiając się na ich zastosowaniu w kontekście choroby wieńcowej. Koncentruje się nie tylko na poznanej dotychczas wartości IPF jako biomarkera aktywności płytkowej, ale także na jego szerokiej dostępności, która również skłoniła mnie do wyboru właśnie tego parametru. Wyniki przedstawione w tym badaniu odgrywają ważną rolę w kontekstualizacji moich własnych rezultatów, umożliwiając wyciągnięcie klinicznie istotnych wniosków i potencjalne sformułowanie nowych hipotez badawczych.

Wszystkie publikacje koncentrują się na zastosowaniu nowych potencjalnych biomarkerów płytkowych w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego i odpowiedzi na leczenie przeciwplateletowe u pacjentów z ACS, leczonych DAPT.

## 5. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W świetle omówionych powyżej zagadnień, celem przedstawionej pracy było poszukiwanie nowych potencjalnych narzędzi użytecznych w optymalizacji i indywidualizacji DAPT u pacjentów leczonych z powodu ACS.

Biorąc pod uwagę częste występowanie ACS w populacji, stosowane w tym celu narzędzia powinny być jak najszerszej dostępne. Wiąże się to z dwoma podstawowymi warunkami: parametry takie powinny być uzyskiwane w sposób łatwy i jak najmniej inwazyjny, a test służący do ich wykonania powinien być efektywny pod względem czasu i kosztów. Wszystkie powyższe warunki w sposób satysfakcjonujący spełnia IPF. Parametr ten we wstępnych badaniach opisanych powyżej wydawał się być obiecujący dla obranych przeze mnie celów. Ponadto, wyzwaniem pozostaje wciąż zidentyfikowanie parametrów, które mogłyby efektywnie służyć do oceny reaktywności płytek krwi, a jednocześnie posiadałyby wyższą skuteczność, stabilność i powtarzalność niż dotychczas znane PFT. Dostępne dane sugerują, że osoczowa ekspresja niektórych miR wykazuje silną korelację z ich ekspresją w płytkach krwi. Cząsteczki te pozostają stabilne, pozwalając na powtarzalne pomiary i mogą być wykryte nawet w minimalnych ilościach pobranej do badania krwi [51].

Głównym celem prac włączonych do cyklu rozprawy doktorskiej była analiza roli IPF, jak również płytkowych miR, w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatek w ACS.

Zaplanowane badanie miało na celu udzielenie odpowiedzi na następujące pytania:

- 1) Czy IPF lub inne parametry niedojrzałych płytek krwi u pacjentów z ACS są związane z reaktywnością płytek krwi mierzoną za pomocą dotychczas stosowanej agregometrii impedancyjnej?
- 2) Czy wyjściowa wartość IPF u pacjentów z ACS leczonych zgodnie ze standardowymi zasadami DAPT ma długoterminowe znaczenie prognostyczne?
- 3) Czy i w jaki sposób poziom ekspresji wybranych płytkowych miR (miR-126-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-197-3p, miR-24-3p) u pacjentów z ACS jest zależny od stosowania różnych antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> na płytkach krwi?

4) Czy ekspresja wybranych płytkowych miRs jest związana z agregacją płytek krwi ocenianą w MEA u pacjentów z ACS?

## **6. KOPIE OPUBLIKOWANYCH PRAC**



**6.1 Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy.**

## Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy

Karolina Gumiężna<sup>1,A–D,F</sup>, Adrian Bednarek<sup>1,B–D,F</sup>, Grażyna Sygitowicz<sup>2,A,C,E,F</sup>, Piotr Barus<sup>1,B,E,F</sup>, Agnieszka Wiśniewska<sup>3,B,F</sup>, Dominika Klimczak-Tomaniak<sup>4,5,A,E,F</sup>, Janusz Kochman<sup>1,E,F</sup>, Grzegorz Opolski<sup>1,E,F</sup>, Marcin Grabowski<sup>1,E,F</sup>, Mariusz Tomaniak<sup>1,A,C,E,F</sup>

<sup>1</sup> First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>4</sup> Department of Cardiology, Hypertension and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>5</sup> Department of Immunology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899–5276 (print), ISSN 2451–2680 (online)

Adv Clin Exp Med. 2023;32(12):1465–1470

### Address for correspondence

Mariusz Tomaniak  
E-mail: mariusz.tomaniak@wum.edu.pl

### Funding sources

The research was funded by the Medical University of Warsaw (grant No. M/MG/71/22).

### Conflict of interest

None declared

Received on August 7, 2023

Reviewed on November 2, 2023

Accepted on December 21, 2023

Published online on December 21, 2023

### Cite as

Gumiężna K, Bednarek A, Sygitowicz G, et al. Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy. *Adv Clin Exp Med.* 2023;32(12):1465–1470. doi:10.17219/acem/177406

### DOI

10.17219/acem/177406

### Copyright

Copyright by Author(s)  
This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

## Abstract

**Background.** Antiplatelet therapy is the cornerstone of treatment for patients presenting with acute coronary syndrome (ACS) treated with percutaneous coronary intervention (PCI). Some patients may not respond to such therapy adequately, which is associated with a greater risk of ischemic events. Reticulated platelets are the youngest, largest, and most active platelet subtype. They have been initially shown to be associated with an increased risk of cardiovascular (CV) events and increased platelet activity.

**Objectives.** The aim of the presented study was to evaluate whether the immature platelet fraction (IPF) reflects the response to antiplatelet treatment in invasively managed ACS patients.

**Materials and methods.** This prospective study enrolled ACS patients treated with PCI and dual antiplatelet therapy (DAPT) comprising acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel or ticagrelor. In all patients, venous blood was collected within 24 h after the procedure. Platelet parameters were measured, including IPF using the Sysmex hematological analyzer and adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet reactivity using the Multiplate<sup>®</sup> Analyzer.

**Results.** A total of 108 patients were enrolled, including 62 with ST-segment elevation ACS (STE-ACS) and 46 with non-ST-segment elevation ACS (NSTEMI-ACS). Of them, 20.4% had diabetes mellitus, 26.9% had a history of MI and 59.2% of smoking. Spearman's correlation analysis demonstrated that higher IPF and immature platelet count (IPC) values are associated with increased ADP-induced platelet reactivity (respectively:  $\rho = 0.387$ , 95% confidence interval (95% CI): 0.101–0.615,  $p = 0.008$ ; and  $\rho = 0.458$ , 95% CI: 0.185–0.666,  $p = 0.001$ ) in NSTEMI-ACS but not in STE-ACS patients.

**Conclusions.** Immature platelet count and IPF may be valuable markers of platelet activity in patients with NSTEMI-ACS treated invasively and receiving DAPT (ClinicalTrials.gov No. NCT06177587).

**Key words:** platelet reactivity, acute coronary syndrome, dual anti-platelet therapy, immature platelet fraction

## Background

Platelets have a significant role in the pathophysiology of cardiovascular (CV) events, including acute coronary syndrome (ACS), especially concerning patients treated invasively.<sup>1,2</sup> Therefore, therapy aimed at inhibiting platelet activity is an essential part of treatment to prevent, i.a., stent thrombosis (ST) or recurrent myocardial infarction (MI). As standard, such patients receive 2 antiplatelet drugs that act by different mechanisms: acetylsalicylic acid (ASA) and a P2Y<sub>12</sub> inhibitor, for 1 year, according to guidelines.<sup>3,4</sup> However, the response to treatment varies significantly depending on individual patients' characteristics, which may require adjusting the intensity or duration of treatment.<sup>5,6</sup> To date, there are no simple and accessible methods to effectively predict, and therefore prevent, high on-treatment platelet reactivity (HTPR).

Immature, newly released to the circulation reticulated platelets (RPs) are more reactive than mature ones.<sup>7</sup> Studies have shown that their levels represented as a percentage of RPs among all platelets, named immature platelet fraction (IPF), may have a predictive value for the occurrence of CV events in patients treated with dual antiplatelet therapy (DAPT).<sup>8–11</sup> However, their exact significance in assessing response to treatment is not fully understood.

## Objectives

The aim of the presented study was to evaluate whether IPF could be a valuable parameter for determining on-treatment platelet reactivity and predicting response to antiplatelet therapy in ACS patients treated with percutaneous coronary intervention (PCI).

## Materials and methods

This was a prospective, single-center study conducted in a tertiary cardiology clinical center. Written informed consent was obtained from each participant. This study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and by the Bioethics Committee of Medical University of Warsaw under reference No. KB/242/2015. The clinical trial was registered with ClinicalTrials.gov under the identifier NCT06177587.

## Patients

Consecutive patients presenting with ACS between July 2017 and May 2018 were enrolled. The inclusion criteria were: age >18 years, admission due to ACS, the need for immediate (<2 h) or early (<24 h) invasive treatment with stent implantation, treatment with DAPT, and ability to sign informed consent. The patients were excluded if they received any other medication that affects platelet

activity or blood coagulation, had any contraindications to take ASA or P2Y<sub>12</sub> inhibitor, or had coagulation disorders. All patients received a loading dose of ASA (300 mg) and P2Y<sub>12</sub> inhibitor (300 mg of clopidogrel or 180 mg of ticagrelor) periprocedurally, and were treated thereafter with 75 mg of ASA daily and either clopidogrel (75 mg once a day) or ticagrelor (90 mg twice a day).

## Laboratory tests

Blood sampling for all analyzed parameters was obtained from the peripheral vein in the first 24 h after PCI. Blood collection had taken place while the patients were still in the catheterization laboratory, before they were transported to the ward, so in 88% of cases, it was performed within the first 2 h after the PCI. Platelet count (PLT), hemoglobin, platelet distribution width, mean platelet volume (MPV), and IPF were assessed in whole blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic (K3EDTA) using an automated hematological analyzer (Sysmex XN 2000; Sysmex, Kope, Japan). In the case of 2 IPF measurements, the average value was used for analyses. Immature platelet count (IPC) was calculated as a product of IPF and PLT. For platelet reactivity measurements, blood samples were drawn from the peripheral vein and collected in hirudin-containing tubes. Impedance aggregometry using Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with adenosine diphosphate (ADP) as agonist was performed 30–120 min after sampling. The test was carried out as instructed by the manufacturer. Maximum platelet aggregation and aggregation velocity are expressed in arbitrary units AUC (area under the curve of aggregation units (AU) over time (min)). Clinical data was collected from an electronic patients' database.

## Statistical analyses

The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics v. 28.0 (IBM Corp., Armonk, USA). The distribution of continuous data was assessed with Shapiro–Wilk test. Data were presented as mean and standard deviation (SD) and compared with Student's t-test, or as median with interquartile range (IQR) and compared with Mann–Whitney U test for parametric and nonparametric variables, respectively. Categorical data were presented as number and percentage. The Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the relationship between platelet aggregation and RPs parameters. Two-sided p-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

A total of 108 ACS patients were enrolled; 62 of them presented with ST-segment elevation ACS (STE-ACS) and 46 with non-ST-segment elevation ACS (NSTEMI-ACS). Baseline characteristics (Table 1) did not differ significantly

**Table 1.** Baseline characteristics (values in bold are statistically significant)

Variable	All (108)	NSTE-ACS (46)	STE-ACS (62)	p-value	
Female gender, n (%)	28 (25.9)	12 (26.1)	16 (25.8)	0.974	
Age [years], mean (SD)	66.7 (10.7)	69.0 (9.2)	65.8 (11.9)	0.084	
HT, n (%)	70 (64.8)	35 (76.1)	35 (56.5)	<b>0.022</b>	
DM, n (%)	22 (20.4)	11 (23.9)	11 (17.7)	0.364	
HL, n (%)	73 (67.6)	31 (67.4)	42 (67.7)	0.903	
HF, n (%)	36 (33.3)	15 (32.6)	21 (33.9)	0.954	
CKD, n (%)	14 (13.0)	10 (21.7)	4 (6.5)	<b>0.017</b>	
Current smoker, n (%)	39 (36.1)	16 (34.8)	23 (37.1)	0.908	
Past smoker, n (%)	25 (23.1)	8 (17.4)	17 (27.4)	0.166	
Previous MI, n (%)	29 (26.9)	15 (32.6)	14 (22.6)	0.245	
Previous PCI, n (%)	19 (17.6)	11 (23.9)	8 (12.9)	0.110	
MVD, n (%)	53 (49.1)	23 (50.0)	30 (48.4)	0.781	
Clopidogrel, n (%)	82 (75.9)	36 (78.3)	46 (74.2)	0.625	
Ticagrelor, n (%)	26 (24.1)	10 (21.7)	16 (25.8)		
Creatinine [mg/dL], median (IQR)	1.02 (0.34)	1.03 (0.38)	1.04 (0.34)	0.320	
eGFR [mL/min/1.73m <sup>2</sup> ], median (IQR)	74.0 (28.0)	68.0 (34.5)	74.5 (25.3)	0.100	
RBC [10 <sup>9</sup> /μL], median (IQR)	4.53 (0.69)	4.46 (0.64)	4.63 (0.70)	0.131	
HGB [g/dL], median (IQR)	14.1 (2.2)	13.8 (2.1)	14.1 (1.9)	0.32	
PLT [10 <sup>3</sup> /μL], median (IQR)	217 (63)	210 (77)	219 (60)	0.546	
Cholesterol [mg/dL], mean (SD)	167 (43)	159 (33)	173 (48)	<b>0.010</b>	
HDL [mg/dL], median (IQR)	41.5 (21.0)	42.5 (21.0)	41.0 (22.5)	0.540	
LDL [mg/dL], mean (SD)	94.3 (37.6)	83.3 (30.4)	103.6 (39.0)	<b>0.008</b>	
TG [mg/dL], median (IQR)	114 (58)	115 (54)	114 (53)	0.208	
EF (%), median (IQR)	49.0 (12.8)	53.5 (9.5)	45.0 (13.5)	<b>&lt;0.001</b>	
Troponin [ng/mL], median (IQR)	10.3 (29.0)	6.0 (17.0)	17.1 (55.1)	<b>0.012</b>	
Number of vessels	1	39 (36.1)	14 (30.4)	25 (40.3)	0.228
	2	25 (23.1)	10 (21.7)	15 (24.2)	
	3	24 (22.2)	13 (28.3)	11 (17.7)	
	4	14 (13.0)	5 (10.9)	9 (14.5)	
	5	6 (5.6)	4 (8.7)	2 (3.2)	
Final TIMI flow, mean (SD)	2.9 (0.5)	3.0 (0.0)	2.8 (0.6)	0.111	
ASA prior to hospitalization, n (%)	23 (21.3)	11 (23.9)	12 (19.4)	0.567	
Satin, n (%)	106 (98.1)	45 (97.8)	61 (98.4)	0.831	
β-blocker, n (%)	97 (89.8)	45 (97.8)	52 (83.9)	<b>0.018</b>	
ACEI/ARB, n (%)	103 (95.4)	44 (95.7)	59 (95.2)	0.904	
CCB, n (%)	12 (11.1)	9 (19.6)	3 (4.8)	<b>0.016</b>	
PPI, n (%)	97 (89.8)	40 (87.0)	57 (91.9)	0.398	

ASA – acetylsalicylic acid; ACEI – angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB – angiotensin receptor blockers; CCB – calcium channel blocker; CKD – chronic kidney disease; DM – diabetes mellitus; EF – ejection fraction; eGFR – estimated glomerular filtration rate; HDL – high-density lipoprotein; HF – heart failure; HGB – hemoglobin; HL – hyperlipidemia; HT – hypertension; PPI – proton pump inhibitor; IQR – interquartile range; LDL – low-density lipoprotein; MI – myocardial infarction; MVD – multi-vessel disease; n – number; NSTE-ACS – non-ST-elevation acute coronary syndrome; PCI – percutaneous coronary intervention; PLT – platelets; RBC – red blood cells; SD – standard deviation; STE-ACS – ST-elevation acute coronary syndrome; TIMI – thrombolysis in myocardial infarction; TG – triglycerides.

between the groups, except for a higher prevalence of hypertension in STE-ACS patients and a greater incidence of chronic kidney disease in the NSTE-ACS group. Additionally, the NSTE-ACS group exhibited lower troponin and cholesterol levels, including LDL, as well as a higher ejection

fraction compared to the STE-ACS group. Ticagrelor was received by 26 (24.1%) and clopidogrel by 82 (75.9%) patients.

The analysis revealed that the level of IPF correlates with ADP-induced platelet reactivity in NSTE-ACS patients ( $\rho = 0.387$ , 95% confidence interval (95% CI): 0.101–0.615,



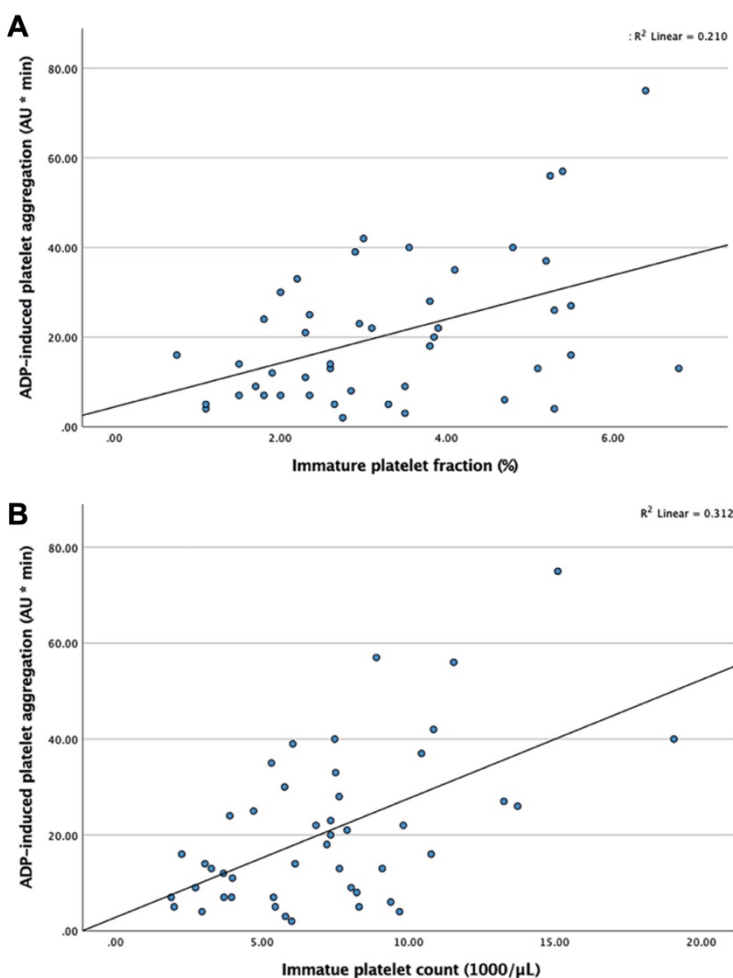


Fig. 1. Correlation between adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet reactivity and (A) immature platelet fraction and (B) immature platelet count

$p = 0.008$ ); Fig. 1). However, this relationship was not observed in the STE-ACS group.

In the NSTEMI-ACS group, 36 patients were treated with clopidogrel and 10 with ticagrelor. We analyzed the relationship between ADP-induced platelet reactivity and IPF in both groups separately. For clopidogrel, the positive correlation was also present ( $\rho = 0.346$ , 95% CI: 0.010–0.612,  $p = 0.039$ ), whereas in the ticagrelor group, the observed correlation did not reach a statistically significant level ( $\rho = 0.610$ , 95% CI:  $-0.054$ – $0.900$ ,  $p = 0.061$ ).

Analysis concerning IPC revealed an even stronger correlation with ADP-induced platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients ( $\rho = 0.458$ , 95% CI: 0.185–0.666,  $p = 0.001$ ). Moreover, this relationship was maintained in both clopidogrel and ticagrelor treated cohorts analyzed separately ( $\rho = 0.378$ , 95% CI: 0.047–0.635,  $p = 0.023$ ; and

$\rho = 0.854$ , 95% CI: 0.467–0.966,  $p = 0.002$ , respectively). Again, the relationship was absent in STE-ACS patients.

Partial Spearman's correlation for potentially confounding variables including age, gender, diabetes mellitus, smoking status, and antiplatelet agent was also performed in the NSTEMI-ACS cohort. It revealed that the relationship between ADP and IPF as well as between ADP and IPC remained while controlling for all the variables mentioned above. The detailed results of the analysis are presented in Supplementary Table 1. Moreover, we showed that clinical presentation did not significantly impact the level of platelet reactivity, also after adjustment for potentially confounding variables (Supplementary Table 2), and that there were no differences in platelet parameters according to diabetes status, insulin treatment and the P2Y<sub>12</sub> inhibitor received (Supplementary Table 3).

## Discussion

We demonstrated that the levels of both studied RP parameters, i.e., IPF and IPC, correlate with ADP-induced platelet aggregometry among patients with NSTEMI-ACS treated with PCI and DAPT. This relationship was not observed in STEMI-ACS patients.

Optimal platelet inhibition stands as a crucial factor influencing the prognosis of post-PCI patients.<sup>12</sup> Inadequate response to antiplatelet treatment remains an open problem related to serious consequences such as ST, MI, or CV death.<sup>13</sup> Despite numerous attempts and tests evaluated so far, routine identification of HTPR on a large scale was not found cost-effective and is currently not recommended in the society guidelines.<sup>3,14</sup>

Several studies have indicated the relationship between the level of RPs and antiplatelet therapy response, particularly notable in patients receiving thienopyridine therapy. However, it was not apparent in the ticagrelor-treated group.<sup>15–18</sup> Most of the patients in our study were treated with clopidogrel. Therefore, the issue of the relationship between IPF and platelet activity in ticagrelor-treated patients remains to be further elucidated. Despite the limited sample size, it is noteworthy that among ticagrelor-treated patients, there was a rising trend in IPF as ADP-induced platelet aggregation levels rose. Moreover, a statistically significant correlation was identified with regard to IPC. Based on the existing literature, the influence of clopidogrel treatment compared to ticagrelor appears to elicit varying effects on IPC levels in a long-term observation.<sup>19</sup> However, our findings, as presented, reveal that baseline platelet parameters and their correlation with platelet reactivity persist irrespective of the administered medication at a saturating dose.

Immature platelets, known for their heightened prothrombotic potential, can be reflected by IPF level – a reliable marker of platelet turnover. Elevated IPF is characteristic for specific patient groups including smokers, diabetics or the ones with ongoing inflammation,<sup>20–23</sup> as well as ACS patients.<sup>24</sup> Baseline IPF serves as a predictor of major adverse CV events (MACE) in patients with coronary artery disease (CAD) treated invasively and with DAPT.<sup>8,9,11</sup> Similar findings extend to IPC, which was also more strongly associated with antiplatelet response.<sup>10,25</sup> Patients with higher baseline levels of both parameters face a higher risk of ischemic events, indicating increased platelet turnover and reactivity despite adequate therapy. Regarding patients treated percutaneously with stent implantation, there is an additional risk of ST.

Interestingly, the correlation in our study did not exist for STEMI-ACS patients. Prior studies suggested that patients with STEMI-ACS have a higher IPF level than NSTEMI-ACS patients.<sup>22</sup> This was not observed in our population, where the distribution of IPF and IPC was similar in both groups. It can be due to the fact that blood parameters were obtained after an initial treatment including PCI and

the loading doses of antiplatelet drugs. Perl et al. described the correlation between RPs level and platelet reactivity in STEMI-ACS patients, yet the measurements in that study were performed 2–4 days after the start of the treatment and later after 30 days.<sup>26</sup> The short interval between the onset of STEMI-ACS and the measurements in our study could be a factor contributing to this observation. Subsequent studies should focus on selecting the most optimal measurement time when IPF or IPC values reliably reflect platelet activity.

Immature platelet fraction can be easily, inexpensively measured using automatic hematology analyzers during a complete blood count test, providing the results quickly.<sup>27,28</sup> The same applies to IPC, which can be calculated from IPF and PLT. As such, RPs parameters may become useful markers for guiding antiplatelet therapy once the above findings are confirmed in further studies with larger cohorts.

## Limitations

Our study predominantly included clopidogrel-treated NSTEMI-ACS patients, warranting further research specific to ticagrelor. The pharmacokinetics and pharmacodynamics differ among P2Y<sub>12</sub> inhibitors. It cannot be excluded that the relationship between platelet reactivity and the level of RPs depends on the drug received. Moreover, our focus on parameters shortly after the procedure prevents us from confirming whether this relationship persists in longer-term follow-up.

## Conclusions

Immature platelet count and IPF may hold promise as potential markers of platelet reactivity in patients with NSTEMI-ACS undergoing invasive treatment and receiving DAPT. Given their accessibility, these markers could prove valuable for assessing an individual's responsiveness to antiplatelet therapy or aid in identifying individuals who are at higher risk of thrombotic events. Further research is needed to establish their effectiveness in this regard.

## Supplementary data

Supplementary materials are available at <https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.10219636>. The package contains the following files:

Supplementary Table 1. Partial Spearman's correlation analysis between ADP and IPF/IPC for potentially confounding variables.

Supplementary Table 2. Multivariate analysis showing the relation between ADP-induced platelet aggregation and the clinical presentation of ACS after adjustment for potential confounding variables.

Supplementary Table 3. The differences between platelet parameters (IPF, IPC and ADP-induced PA) in groups divided by diabetic status, insulin intake or P2Y12 inhibitor used.




## Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Consent for publication

Not applicable.

## ORCID iDs

Karolina Gumiężna  <https://orcid.org/0000-0002-3423-9832>  
 Adrian Bednarek  <https://orcid.org/0000-0002-3600-4551>  
 Grażyna Sygitowicz  <https://orcid.org/0000-0002-0057-4253>  
 Piotr Barus  <https://orcid.org/0000-0003-2567-5349>  
 Dominika Klimczak-Tomaniak  <https://orcid.org/0000-0001-8825-511X>  
 Janusz Kochman  <https://orcid.org/0000-0001-8239-8726>  
 Grzegorz Opolski  <https://orcid.org/0000-0003-4744-2554>  
 Marcin Grabowski  <https://orcid.org/0000-0003-3306-0301>  
 Mariusz Tomaniak  <https://orcid.org/0000-0003-0966-3313>

## References

- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schömig A. Platelet activation and coronary stent implantation: Effect of antithrombotic therapy. *Circulation*. 1996;94(3):279–285. doi:10.1161/01.CIR.94.3.279
- Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med*. 2003;3(2):147–162. doi:10.1055/s-2003-40673
- Collet JP, Thiele H, Barabato E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289–1367. doi:10.1093/eurheartj/ehaa575
- Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119–177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393
- Marcucci R, Grifoni E, Giusti B. On-treatment platelet reactivity: State of the art and perspectives. *Vascul Pharmacol*. 2016;77:8–18. doi:10.1016/j.vph.2015.10.005
- Kamran H, Jneid H, Kayani WT, et al. Oral antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: A review. *JAMA*. 2021;325(15):1545–1555. doi:10.1001/jama.2021.0716
- Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol*. 1995;23(9):996–1001. PMID:7635185.
- Bongiovanni D, Schreiner N, Gosetti R, et al. Immature platelet fraction predicts adverse events in patients with acute coronary syndrome: The ISAR-REACT 5 Reticulated Platelet Substudy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(2):e83–e93. doi:10.1161/ATVBAHA.122.318614
- Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients: Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):846–853. doi:10.1160/TH12-09-0709
- Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, DeLao T, Barker CM, Kleiman NS. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(20):2122–2129. doi:10.1016/j.jacc.2014.06.1210
- Faber J, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL, Adelborg K. Immature platelets and risk of cardiovascular events among patients with ischemic heart disease: A systematic review. *Thromb Haemost*. 2021;121(5):659–675. doi:10.1055/s-0040-1721386
- Gorog DA, Geisler T. Platelet inhibition in acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention: Insights from the past and present. *Thromb Haemost*. 2020;120(4):565–578. doi:10.1055/s-0040-1702920
- Trenk D, Kristensen SD, Hochholzer W, Neumann FJ. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonists in clinical trials. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):834–845. doi:10.1160/TH12-08-0588
- Sibbing D, Aradi D, Alexopoulos D, et al. Updated expert consensus statement on platelet function and genetic testing for guiding P2Y12 receptor inhibitor treatment in percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv*. 2019;12(16):1521–1537. doi:10.1016/j.jcin.2019.03.034
- Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2015;36(45):3202–3210. doi:10.1093/eurheartj/ehv326
- Stratz C, Nührenberg T, Valina CM, et al. Impact of reticulated platelets on the antiplatelet effect of the intravenous P2Y12-receptor inhibitor cangrelor. *Thromb Haemost*. 2018;118(2):362–368. doi:10.1160/TH17-07-0466
- Verdoia M, Sartori C, Pergolini P, et al. Immature platelet fraction and high-on treatment platelet reactivity with ticagrelor in patients with acute coronary syndromes. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41(4):663–670. doi:10.1007/s11239-015-1279-2
- Verdoia M, Pergolini P, Rolla R, Suryapranata H, Kedhi E, De Luca G. Impact of immature platelet fraction on platelet reactivity during prasugrel maintenance treatment. *Platelets*. 2019;30(7):915–922. doi:10.1080/09537104.2018.1535707
- Verdoia M, Pergolini P, Rolla R, et al. Impact of long-term dual antiplatelet therapy on immature platelet count and platelet reactivity. *Angiology*. 2018;69(6):490–496. doi:10.1177/0003319717736407
- Gumiężna K, Barus P, Sygitowicz G, et al. Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring. *Cardiol J*. 2023;30(5):817–824. doi:10.5603/CJ.a2023.0019
- Nardin M, Verdoia M, Negro F, Rolla R, Tonon F, De Luca G. Impact of active smoking on the immature platelet fraction and its relationship with the extent of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(2):e13181. doi:10.1111/eci.13181
- Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):151–156. PMID:19132202.
- Mijovic R, Kovacevic N, Zarkov M, Stosic Z, Cabarkapa V, Mitic G. Reticulated platelets and antiplatelet therapy response in diabetic patients. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;40(2):203–210. doi:10.1007/s11239-014-1165-3
- Bongiovanni D, Han J, Klug M, et al. Role of reticulated platelets in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(5):527–539. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316244
- Stratz C, Bömicke T, Younas I, et al. Comparison of immature platelet count to established predictors of platelet reactivity during thienopyridine therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(3):286–293. doi:10.1016/j.jacc.2016.04.056
- Perl L, Lerman-Shivek H, Rechavia E, et al. Response to prasugrel and levels of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(6):513–517. doi:10.1016/j.jacc.2013.07.110
- Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2004;126(1):93–99. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04987.x
- Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y, Ikeda Y, Kubota F, Nakamoto H. Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. *Eur J Haematol*. 1995;54(3):163–171. doi:10.1111/j.1600-0609.1995.tb00209.x

## **6.2 Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function.**



Article

# Platelet microRNAs as Potential Novel Biomarkers for Antiplatelet Therapy with P2Y<sub>12</sub> Inhibitors and Their Association with Platelet Function

Karolina Gumieźna <sup>1</sup>, Adrian Bednarek <sup>1</sup>, Grażyna Sygitowicz <sup>2</sup>, Agata Maciejak-Jastrzębska <sup>2</sup>, Piotr Baruś <sup>1</sup>, Jaromir Hunia <sup>1</sup>, Dominika Klimczak-Tomaniak <sup>3,4</sup>, Janusz Kochman <sup>1</sup>, Marcin Grabowski <sup>1</sup> and Mariusz Tomaniak <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland; kgumiezna@gmail.com (K.G.)

<sup>2</sup> Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; gsygitowicz@poczta.onet.pl (G.S.); agata.maciejak@wum.edu.pl (A.M.-J.)

<sup>3</sup> Department of Cardiology, Hypertension and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

<sup>4</sup> Department of Immunology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

\* Correspondence: mariusz.tomaniak@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-599-19-58; Fax: +48-22-599-19-57



**Citation:** Gumieźna, K.; Bednarek, A.; Sygitowicz, G.; Maciejak-Jastrzębska, A.; Baruś, P.; Hunia, J.; Klimczak-Tomaniak, D.; Kochman, J.; Grabowski, M.; Tomaniak, M. Platelet microRNAs as Potential Novel Biomarkers for Antiplatelet Therapy with P2Y<sub>12</sub> Inhibitors and Their Association with Platelet Function. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 63. <https://doi.org/10.3390/jcm13010063>

Academic Editor: Christoph Sinning

Received: 23 October 2023

Revised: 14 December 2023

Accepted: 20 December 2023

Published: 22 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Introduction: Patients with acute coronary syndrome (ACS) undergoing percutaneous coronary intervention (PCI) require dual antiplatelet therapy (DAPT). However, the response to treatment can vary considerably. Certain platelet microRNAs (miRs) are suspected to predict DAPT response and influence platelet function. This study aimed to analyze selected miRs' expressions and compare them among patients treated with different P2Y<sub>12</sub> inhibitors while assessing their association with platelet activity and turnover parameters. Materials and methods: We recruited 79 ACS patients post-PCI treated with clopidogrel, ticagrelor, or prasugrel, along with 18 healthy volunteers. Expression levels of miR-126-3p, miR223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p, and miR-24-3p, as well as immature platelet fraction (IPF) and ADP-induced platelet reactivity, were measured and compared between groups. Results: Analyses revealed significantly lower expressions of miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, and miR-197-3p in patients treated with ticagrelor, compared to clopidogrel (fold changes from −1.43 to −1.27, *p*-values from 0.028 to 0.048). Positive correlations were observed between platelet function and the expressions of miR-223-3p (*r* = 0.400, *p* = 0.019) and miR-21-5p (*r* = 0.423, *p* = 0.013) in patients treated with potent drugs. Additionally, miR-24-3p (*r* = 0.411, *p* = 0.012) and miR-197-3p (*r* = 0.333, *p* = 0.044) showed correlations with IPF. Conclusions: The identified platelet miRs hold potential as biomarkers for antiplatelet therapy. (ClinicalTrials.gov number, NCT06177587).

**Keywords:** acute coronary syndrome; dual antiplatelet therapy; microRNA; platelet reactivity; P2Y<sub>12</sub> inhibitors

## 1. Introduction

Dual antiplatelet therapy (DAPT) is a standard treatment for patients with acute coronary syndrome (ACS) who undergo percutaneous coronary intervention (PCI). It consists of acetylsalicylic acid (ASA) and the inhibitor of the P2Y<sub>12</sub> receptor, which most commonly is either clopidogrel, ticagrelor, or prasugrel. This treatment is crucial for the prevention of stent thrombosis (ST) or recurrent myocardial infarction (MI), as well as for the reduction in the long-term risk of cardiovascular (CV) death [1].

However, even 30% of the population can show inadequate platelet inhibition, resulting in high on-treatment platelet reactivity (HTPR) during DAPT with clopidogrel, which is associated with a greater risk of ST or CV events [2–4]. The variability in responses to

prasugrel and ticagrelor is lower than in responses to clopidogrel but still present [5,6]. However, little is known about the indicators that can predict this state.

Unfortunately, the tests measuring platelet reactivity available so far are not routinely performed before or during DAPT, and they appear in ESC guidelines with a low class of recommendation (class IIb), due to multiple limitations [7,8]. Therefore, there is still a need for novel biomarkers that would be useful in predicting the risk of HTPR occurrence, thus enabling better individual DAPT strategy planning and monitoring.

MicroRNAs (miRs) are short (18–25 nucleotides), non-coding RNAs that regulate gene expression. Many of them target messenger RNAs (mRNAs) that encode proteins involved in platelets' activation and aggregation, thereby influencing the regulation of their expression. Some studies suggest that the level of the most abundant platelet-expressed miRs may be a potential marker of antiplatelet reactivity and response, yet their importance is still unclear and requires further research [9].

The primary aim of our study was to evaluate the correlation between DAPT with the use of different P2Y<sub>12</sub> inhibitors and the expressions of selected miRs: miR-126-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-197-3p, and miR-24-3p. Moreover, we attempted to assess their role in the regulation of platelet function and turnover by investigating their relationship with ADP-induced platelet aggregometry and immature platelet fraction (IPF) levels.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Population

This was a prospective, single-center study performed in the 1st Chair and Department of Cardiology, Medical University of Warsaw. Seventy-nine patients who underwent PCI and received DAPT were recruited between March 2016 and May 2018. DAPT consisted of a low dose (75 mg) of ASA in all patients and either 75 mg clopidogrel once a day (n = 40), 90 mg ticagrelor twice a day (n = 21), or 10 mg of prasugrel daily (n = 18). Before PCI, patients received 300 mg of ASA and the loading dose of the P2Y<sub>12</sub> inhibitor (either 300 mg of clopidogrel, 180 mg of ticagrelor, or 60 mg of prasugrel). The inclusion criteria were: age > 18 years old, diagnosis of ACS, and treatment with PCI during hospitalization, followed by DAPT. The patients were excluded if informed consent could not be obtained or if the miR expression was not assessed. Moreover, the exclusion criteria were: other treatment that had an impact on platelet function or coagulation, including ongoing DAPT prior to admission; low (<30%) or high (>52%) hematocrit; and low platelet count (<100 × 10<sup>9</sup>/L). The control group (n = 18) was chosen from among healthy individuals with no history of coronary artery disease and no documented intake of medications affecting platelet function or coagulation currently or in the past. Blood samples for all the measurements were collected in the first 24 h after the PCI. Blood was collected in the catheterization laboratory before patients were moved to the ward, with more than 90% of cases involving collection after approximately two hours after the PCI procedure. The study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Approval from the local medical ethics committee was obtained. The study was registered with [ClinicalTrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT06177587.

### 2.2. Sample Processing and miRNA Isolation

Whole blood samples were collected from each individual into serum separator tubes using standard phlebotomy techniques. Serum was fractionated from whole blood samples following the manufacturer's protocol and was stored at −80 °C prior to the analysis. The serum samples were analyzed using spectrophotometry to be free from hemoglobin [10].

Total RNA was isolated from 200 µL of serum using miRCURYTM RNA Isolation Kit–Biofluids (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark), with DNase digestion on-column. For increased reproducibility and for quality control of extraction efficiency, carrier RNA from the bacteriophage MS2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and a mix of three synthetic control templates (RNA Spike-in mix UniSp2, UniSp4, and UniSp5; Exiqon A/S) were added to the samples just before purification.

### 2.3. Quantitative Real-Time RT-PCR and Data Analyzes

First-strand cDNA synthesis was performed using the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon A/S), with the addition of a mixture of two synthetic spike-ins, UniSp6 and cel-miR-39-3p (Exiqon A/S). The expression levels of selected miRNAs (has-miR-126-3p, has-miR-21-5p, has-miR-223-3p, has-miR-197-3p, has-miR-24-3p, and miR-21-5p) and potential reference candidates (has-let-7i-5p and has-miR-103a-3p) were evaluated using microRNA LNATM PCR primer sets and ExiLENT SYBR® Green Master Mix (Exiqon A/S on the LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)). The amplification curves were analyzed using the Roche LC software (version 1.5), both for the determination of the crossing-point (Cp) values (by the second derivative method) and for melting curve analysis. RT-qPCR data were normalized to let-7i-5p, which was the most stable reference miR. The expression level of each miR was represented by the fold change, which was calculated using the REST 2009 software (Relative Expression Software Tool V2.0.13, Qiagen GmbH (Hilden, Germany)) [11].

### 2.4. Platelet Reactivity and Other Blood Parameters

Blood samples were drawn from the peripheral vein and collected into hirudin-containing tubes. Impedance aggregometry by Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using adenosine diphosphate (ADP) as the agonist was performed 30–120 min after sampling. Maximum platelet aggregation and aggregation velocity were expressed in arbitrary units (AUC, aggregation units [AU] × minutes). Platelet count, hemoglobin, white blood cell count, platelet distribution width, mean platelet volume (MPV), and IPF were assessed in whole blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic (K3EDTA) using an automated hematological analyzer (Sysmex XN 2000, Kope, Japan).

### 2.5. Statistical Methods

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 28.0 (IBM, New York, NY, USA). For continuous variables, the Shapiro–Wilk test was carried out to assess the normality of distribution. The parametric variables were presented as means and standard deviations (SD), while parameters with distributions other than normal were presented as the median along with the interquartile range (IQR), encompassing the 25th and 75th percentiles. The differences between groups were compared using ANOVA or the Kruskal–Wallis test as appropriate. Categorical variables were presented as numbers with percentages and compared using the Chi-square test. Correlation analyses between non-parametric variables were performed with Spearman’s rho. All reported *p*-values were two-sided, and *p* < 0.05 was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Population

A total of 97 patients were enrolled in the study, including 79 patients after PCI receiving DAPT, and 18 healthy volunteers. The mean age in the study group was 61.3 years. A total of 61 patients (77.2%) were male, 21 (26.6%) were diagnosed with diabetes mellitus, 60 (75.9%) had hyperlipidemia, 43 (54.5%) had a history of smoking (including past and current smokers), and 17 (21.5%) had a history of previous MI. The study group was divided based on the P2Y<sub>12</sub> inhibitor they received. The mean ages were 66.1, 60.3, and 56.1 years in the clopidogrel, ticagrelor, and prasugrel groups, respectively. Apart from that, there were no significant differences between the groups. The baseline characteristics are presented in Table 1.



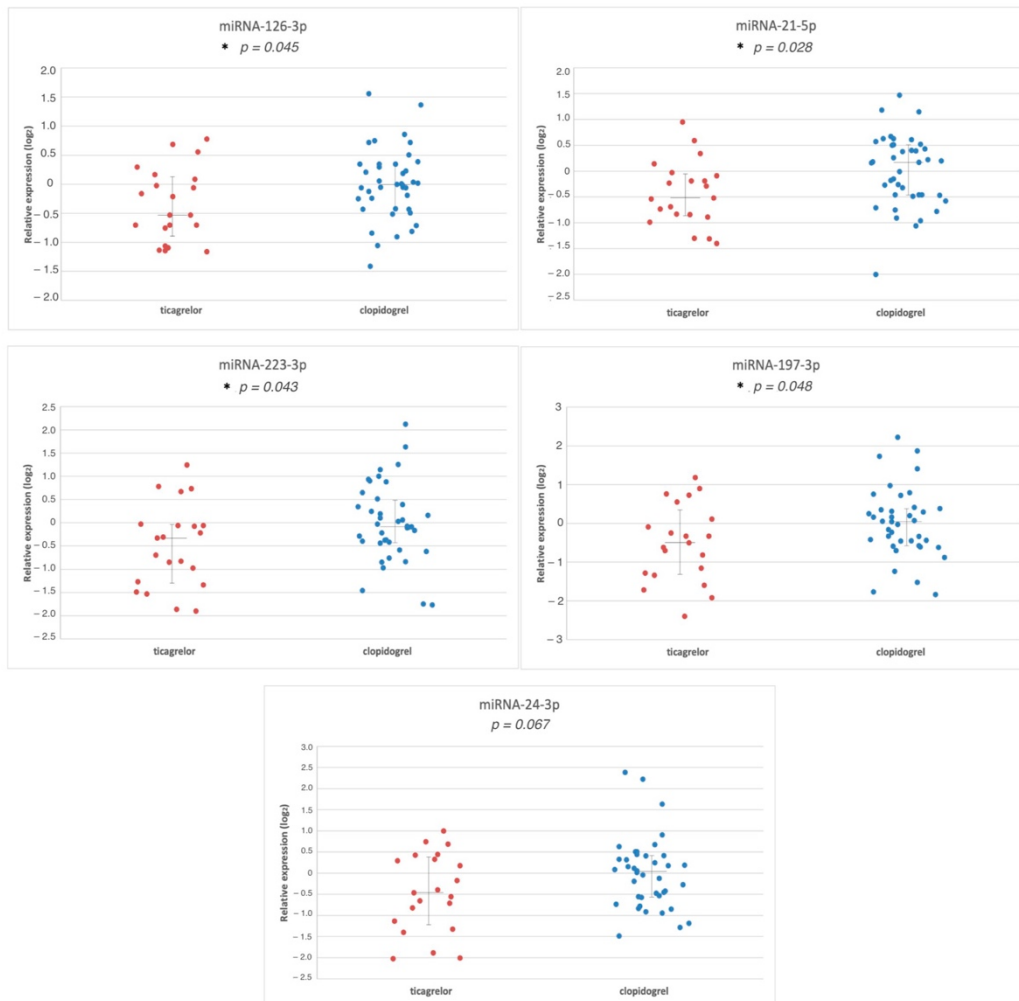
**Table 1.** Baseline characteristics. Bold values represent statistical significance at the  $p < 0.05$  level. Abbreviations: ACEI—angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB—angiotensin II receptor blocker; BB—beta blocker; CABG—coronary artery bypass grafting; CCB—calcium channel blocker; DM—diabetes mellitus; HL—hyperlipidemia; Hgb—hemoglobin; HT—hypertension; LVEF—left ventricle ejection fraction; MI—myocardial infarction; n—number; PCI—percutaneous coronary intervention; PLT—platelet count; PPI—proton pump inhibitor; SD—standard deviation; STEMI—ST-elevation myocardial infarction; y—years.

	All (n = 79)	Clopidogrel (n = 40)	Ticagrelor (n = 21)	Prasugrel (n = 18)	p-Value
Mean age, y (SD)	61.3 (11.7)	66.1 (9.2)	60.3 (12.2)	56.1 (12.4)	<b>0.002</b>
Male sex, n (%)	61 (77.2)	30 (75.0)	15 (71.4)	16 (88.9)	0.386
HT, n (%)	58 (73.4)	29 (72.5)	14 (66.7)	15 (83.3)	0.493
DM, n (%)	21 (26.6)	11 (27.5)	3 (14.3)	7 (38.9)	0.219
HL, n (%)	60 (75.9)	34 (85.0)	16 (76.2)	10 (55.5)	0.053
Past smokers, n (%)	16 (20.3)	11 (27.5)	2 (9.5)	3 (16.7)	0.230
Current smokers, n (%)	27 (34.2)	10 (25.0)	10 (47.6)	7 (38.9)	0.186
Previous MI, n (%)	17 (21.5)	9 (22.5)	5 (23.8)	3 (16.7)	0.844
Previous PCL, n (%)	19 (24.1)	11 (27.5)	6 (28.6)	2 (11.1)	0.342
Previous CABG, n (%)	3 (3.8)	1 (2.5)	2 (9.5)	0 (0.0)	0.249
Mean LVEF, % (SD)	49.1 (10.2)	49.0 (11.7)	47.9 (7.9)	50.3 (9.4)	0.818
STEMI	44 (55.7)	22 (55.0)	10 (47.6)	12 (66.7)	0.487
Statin, n (%)	79 (100)	40 (100)	21 (100)	18 (100)	1.0
BB, n (%)	69 (87.3)	37 (92.5)	18 (85.7)	14 (77.8)	0.286
ACEI/ARB, n (%)	74 (93.7)	38 (95.0)	20 (95.2)	16 (88.9)	0.637
CCB, n (%)	12 (15.2)	8 (20.0)	2 (9.5)	2 (11.1)	0.479
PPI, n (%)	74 (93.7)	37 (92.5)	20 (95.2)	17 (94.4)	0.906
Creatinine [mg/dL]	0.94	0.97	0.91	0.94	0.831
median (25; 75 percentile)	(0.82; 1.13)	(0.84; 1.15)	(0.81; 1.12)	(0.80; 1.1)	
Hgb [g/dL]	13.8	13.6	13.9	14.3	0.662
median (25; 75 percentile)	(12.4; 14.6)	(12.2; 14.7)	(12.2; 14.4)	(12.4; 15.5)	
PLT $10^3/\mu\text{L}$	220	215	223	227	0.336
median (25; 75 percentile)	(194; 252)	(201; 250)	(192; 265)	(176; 271)	

### 3.2. Comparison of miR Expression between Groups

Among five investigated miRs, the levels of four were statistically significantly decreased in ticagrelor- vs. clopidogrel-treated patients (Figures 1 and 2). They included miR-126-3p (fold change  $-1.27$ ,  $p = 0.045$ ), miR223-3p (fold change  $-1.41$ ,  $p = 0.043$ ), miR-21-5p (fold change  $-1.35$ ,  $p = 0.028$ ), and miR197-3p (fold change  $-1.43$ ,  $p = 0.048$ ). The level of miR24-3p was also reduced; however, the difference did not reach statistical significance (fold change  $-1.36$ ,  $p = 0.067$ ). Moreover, patients treated with ticagrelor manifested a decreased expression of miR-126-3p (fold change  $-1.41$ ,  $p = 0.031$ ), and patients treated with clopidogrel manifested an increased expression of miR-223-3p (fold change  $1.51$ ,  $p = 0.023$ ) when compared to the prasugrel-treated group (Figure 2). There were no other statistical differences in miR expression for the prasugrel-treated group; however, due to the small size of this population, they cannot be definitely excluded.

Only the serum levels of miR-126-3p and miR-21-5p were statistically significantly altered in patients treated with clopidogrel and ticagrelor, compared with the control group. The expression level of miR-126-3p was significantly decreased in patients treated with clopidogrel versus the control group (fold change  $-1.37$ ,  $p = 0.010$ ) and in patients treated with ticagrelor versus the control group (fold change  $-1.75$ ,  $p < 0.001$ ). The expression level of miR-21-5p was down-regulated in patients treated with ticagrelor versus the control group (fold change  $-1.65$ ,  $p = 0.003$ ).

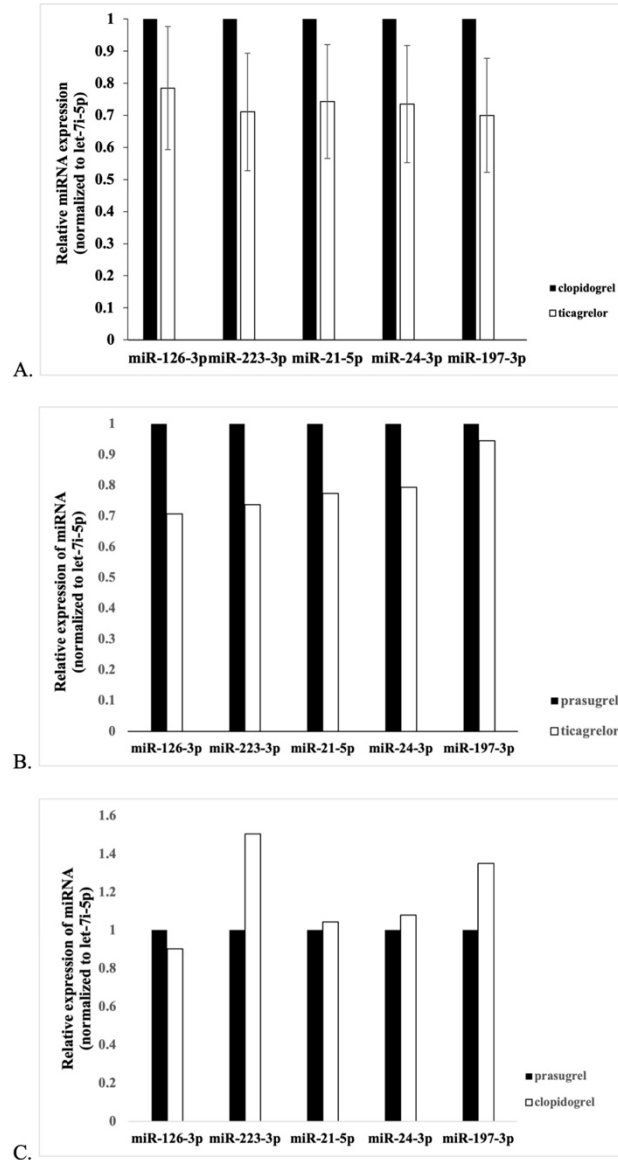


**Figure 1.** The relative expressions of microRNAs: log<sub>2</sub> ratio of fold change (normalized to let-7i-5p).  $p$ -value < 0.05 was considered statistically significant (\*). The lines represent the median fold change in the 25th and 75th percentiles.

### 3.3. Expression of miR vs. Platelet Function and Platelet Turnover

The impedance aggregometry with ADP was performed in 63 patients treated with DAPT. Among them, 29 were treated with clopidogrel and 34 with a potent P2Y<sub>12</sub> inhibitor (19 with ticagrelor and 15 with prasugrel). The latter was pooled into one group, due to the lack of significant differences in ADP-induced platelet aggregometry levels in previous studies between ticagrelor- and prasugrel-treated patients [12]. We observed a positive correlation between platelet function and the expressions of the following particles: miR-223-3p ( $r = 0.400$  CI: 0.062–0.656,  $p = 0.019$ ) and miR-21-5p ( $r = 0.423$  CI: 0.088–0.671,  $p = 0.013$ ) in patients treated with a potent medication. The IPF level was measured in 37 patients (treated with clopidogrel or ticagrelor), and a correlation was found only with

miR-24-3p ( $r = 0.411$  CI: 0.090–0.654,  $p = 0.012$ ) and miR-197-3p ( $r = 0.333$  CI: 0.0–0.6,  $p = 0.044$ ). Complete results of the correlation analyses are shown in Table 2.



**Figure 2.** Relative expressions of miRNAs between investigated groups. Results were determined by RT-qPCR and normalized to let-7i-5p. Data are presented as expression ratio  $\pm$  standard error. (A) Significant differences ( $p$ -value < 0.05) for miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, and miR-197-3p. (B) Significant differences ( $p$ -value < 0.05) for miR-126-3p. (C) Significant differences ( $p$ -value < 0.05) for miR-223-3p

**Table 2.** The results of correlation analyses performed for selected micro-RNAs and platelet functions measured with impedance aggregometry, with ADP used as the agonist and with platelet turnover represented by IPF. Bold values represent statistical significance at the  $p < 0.05$  level. Abbreviations: IPF—immature platelet fraction, miR—micro-RNA, rho—Spearman’s rho, \*— $p < 0.05$ .

	miR-126-3p		miR-223-3p		miR-21-5p		miR-24-3p		miR-197-3p	
	<i>p</i> -Value	Rho	<i>p</i> -Value	Rho	<i>p</i> -Value	Rho	<i>p</i> -Value	Rho	<i>p</i> -Value	Rho
Aggregometry (n = 63)	0.600	0.067	0.119	0.199	0.128	0.194	0.363	0.117	0.324	0.126
Aggregometry, clopidogrel (n = 29)	0.468	−0.14	0.971	−0.007	0.491	−0.133	0.909	−0.022	0.984	−0.004
Aggregometry, potent P2Y <sub>12</sub> inhibitors (n = 34)	0.271	0.194	<b>0.019 *</b>	<b>0.400</b>	<b>0.013 *</b>	<b>0.423</b>	0.196	0.227	0.212	0.220
Aggregometry, ticagrelor (n = 19)	0.661	0.125	0.180	0.321	0.068	0.427	0.811	0.059	0.668	0.105
Aggregometry, prasugrel (n = 14)	0.850	0.054	0.930	−0.025	0.732	0.096	0.685	0.114	0.732	−0.096
IPF (n = 37)	0.295	0.177	0.256	0.126	0.391	0.145	<b>0.012 *</b>	<b>0.411</b>	<b>0.044 *</b>	<b>0.333</b>

Based on ADP levels, all the patients were divided into three subgroups: hyperresponders (AUC < 21), normoresponders (AUC 21–47), and hyporesponders (AUC > 47). The analysis of the expression of studied miRs between groups revealed that the levels of miR-126-3p and miR-21-3p differed significantly among groups. The expression of miR-126 was higher in normoresponders than in both hyper- ( $p = 0.021$ ) and hyporesponsive patients ( $p = 0.040$ ). MiR-21-5p was also the highest in the middle group ( $p = 0.005$  and  $p = 0.027$  for greater and inadequate response, respectively). Other differences inside the groups included lower expressions of miR-223 and miR-24 in hyperresponders than in normoresponders, with no significant differences when compared with the HTPR group.

#### 4. Discussion

The presented study assessed the expression of selected miRs involved in platelet activation depending on selected pharmacological treatment in ACS patients. MiR-126, miR-21, miR-223, miR-197, and miR-24 are the most highly expressed miRs in platelets and can regulate protein production, affecting platelet activation [13]. The results of our study could be summarized as follows: (i) DAPT is associated with the decreased levels of several platelet miRs; (ii) the choice of P2Y<sub>12</sub> inhibitor possibly has an impact on miR levels; (iii) expressions of miR-223-3p and miR-21-5p showed correlation with platelet function in patients treated with potent P2Y<sub>12</sub> inhibitors (the higher the expression of miRs, the higher the ADP-induced platelet aggregation level) but not with clopidogrel; and (iv) miR-24-3p and miR-197-3p showed correlation with the platelet turnover marker (i.e., IPF).

MiR-223 is one of the most abundantly expressed platelet miRs responsible for down-regulating the expression of the P2Y<sub>12</sub> receptor gene (*P2RY12*). It was shown to target 3’UTR of P2Y<sub>12</sub> mRNA [14]. Opposite to some previous works, we described its lower expression in high responders [15,16]. However, previous works differed from ours in several aspects, including the choice of study group, the selection of the P2Y<sub>12</sub>-inhibiting agent, and the test used for platelet reactivity assessment. The existing research examining the relationship between miR-223 and platelet reactivity during treatment has predominantly concentrated on the use of clopidogrel therapy. We showed that the relationship was present in patients treated with other P2Y<sub>12</sub> inhibitors, though in an opposite direction. Spearman correlation analysis revealed that in a group of patients treated with a potent inhibitor, that is, ticagrelor or prasugrel, lower miR-223 expression was associated with decreased platelet reactivity. Also, the use of a potent drug was associated with its lower expression than in clopidogrel-treated individuals. In our patient cohort, measurements were conducted on the first day, usually after 2 h following the administration of a saturating dose. We suspect that the more effective inhibition of the P2Y<sub>12</sub> receptor during this initial period could be primarily attributed to the downregulation of miR-223 expression, serving as a potential feedback mechanism to regulate platelet activity.



Interestingly, miR-21 function has been defined both as protective and impairing on endothelial function, depending on the conditions [17,18]. The exact pathways that are involved in this process have not been clearly defined yet, due to the multiplicity of the target genes, but previous reports revealed an association of its level with recurrent venous thromboembolism [19]. The correlation analysis also revealed that a higher expression of miR-21 is associated with greater platelet reactivity in patients treated with a potent inhibitor. Its functional role in platelets and megakaryocytes was shown before [20], indicating that its levels correlate with several platelet-derived profibrotic factors and may be related to platelet count. That stays in line with our finding showing a lower expression of miR-21 in hyperresponsive patients, as high responsiveness may be related both to the decreased production of profibrotic particles or to reduced platelet formation. And conversely, higher levels of miR-21 could cause greater platelet reactivity. However, the expression of this particle was also the highest in the normal-response group, a finding that remains without known justification at this time.

Platelet activation and aggregation play crucial roles in the processes underlying cardiovascular disorders. Insufficient platelet inhibition when on DAPT may result in higher rates of adverse events, such as MI and CV death. Previous analyses revealed that the expression patterns of three specifically chosen miRs served as effective indicators for predicting MI. Notably, miR-126 exhibited a positive association with the incidence of MI, whereas miR-223 and miR-197 displayed an inverse relationship in this context [21]. As we showed, miR-223 expression was the highest in normoresponders, namely patients with the most well-balanced treatment platelet reactivity. That might explain the higher rates of adverse cardiovascular events in groups with lower levels of miR-223. However, we observed the same trend considering miR-126, though the views of previous studies remain unclear. On the other hand, Hromadka et al. observed opposite findings, i.e., the higher the miR-223 level, the greater the risk of acute MI. Additionally, the investigation identified that individuals at the utmost risk of experiencing MI were those characterized by elevated expression levels of miR-223 and concurrently diminished levels of miR-126, as assessed by their respective ratios [22]. In the view of presented findings, the roles of miR-223 and miR-126 in predicting MACE are evident but not fully understood. It should also be remembered that other phenomena, such as platelet exhaustion, may have an impact on the presented results; however, a dedicated study focused on a particular mechanism ought to be performed.

The expression of miRs was also dependent on the chosen treatment. Opposite to a previous preliminary study [23], we showed that the expression of miR-223 differed significantly among treatment groups, being higher in clopidogrel than both ticagrelor- and prasugrel-treated patients. However, this preliminary study was performed on a smaller cohort of 21 patients (10 and 11 patients in subgroups) and, contrary to our study, excluded patients with STEMI. Based on the outcomes of the correlation analysis, which demonstrated that the relationship existed for ticagrelor- or prasugrel-treated patients only, we assumed that potent P2Y<sub>12</sub> inhibitors may have a greater impact on miR-223 expression than clopidogrel. However, the comparison between treated patients and the control group revealed that miR-126-3p expression is influenced by clopidogrel treatment as well. Contrasting these results with the study by Willeit et al. allows us to find similarity in terms of the effect of clopidogrel therapy on miR-126 expression and the lack of effect on miR-21, miR-24, and miR-197 [13]. The only difference remains in terms of miR-223, which was influenced by clopidogrel treatment in a previous study but not in our study. Willeit et al. also found that with stronger inhibition, the level of miRs is more affected by the therapy. The findings presented above allow us to partially confirm that the use of ticagrelor caused a more significant reduction in miR levels than clopidogrel treatment. Unfortunately, we performed measurements at one time point (at the start of treatment within 24 h after PCI, usually about 2 h after the initial loading dose), which did not allow us to verify the impact of the duration of therapy on changes in miRs expressions. Moreover, we showed that there was not only a significant difference between clopidogrel and new P2Y<sub>12</sub> inhibitors, but also



that the level of miR-126 was reduced in ticagrelor when compared to prasugrel-treated patients. The groups treated with each drug did not differ significantly in characteristics apart from age. Simon et al. conducted an investigation into the relationship between age and the most highly expressed platelet miRs among other factors. Their findings did not reveal any evidence suggesting differential expression of the studied particles based on age [24]. Therefore, we suspect that this difference did not significantly affect the results we obtained.

Antiplatelet therapy plays a crucial role in the prevention of ST or recurrent MI in patients after PCI. However, the response to antiplatelet drugs varies among patients; thus, an individualized approach in pharmacologic management is warranted, with it being a cornerstone for maintaining a perfect balance between bleeding and thrombosis risk. Evidence suggests that platelet miRs are stable in serum and plasma, which translates into a good correlation of the level of circulating miRs with their platelet expression. Considering our current discoveries and the findings from previous research, it is reasonable to entertain the notion that platelet miRs could serve not only as reliable predictors of the response to antiplatelet therapy but also as indicative markers for precise monitoring. Nevertheless, to thoroughly assess their correlation with cardiovascular outcomes, further studies involving the measurement of miR levels during therapy are warranted.

While our study provides valuable insights, it is essential to acknowledge certain limitations inherent in our research. A notable constraint was the relatively small size of the patient group under investigation. Moreover, the measurements of platelet reactivity were not obtained for all the patients, which carries the risk of bias. However, the doctors and nurses included in the diagnostic and therapeutic processes as well as the researchers obtaining blood for platelet reactivity measurements were blinded to the results of the miR expression in order to minimize this risk. Finally, the measurements of all the studied parameters were performed only at one time point, which did not allow us to compare miR association with the response to treatment over time. We, however, find it interesting in the light of our findings and believe that future research should also focus on this aspect.

## 5. Conclusions

The presented study showed how the most highly expressed platelet miRs are affected by the application of DAPT and the choice of P2Y<sub>12</sub> inhibitor. Moreover, the expressions of several miRs showed a relationship with platelet function. If confirmed on a larger cohort, the findings may contribute to figuring out a way to use platelet miRs as biomarkers for guiding antiplatelet therapy.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.G. and M.T.; methodology: K.G., G.S. and M.T.; data collection: A.B., K.G., M.T. and P.B.; laboratory analyses: A.M.-J. and G.S.; statistical analyses: K.G., A.M.-J., A.B. and G.S.; writing—original draft preparation: K.G., A.B., J.H. and P.B.; writing—review and editing: M.T., G.S., D.K.-T., M.G. and J.K.; visualization, G.S., A.M.-J., K.G. and J.H.; supervision, M.T., G.S., D.K.-T., M.G. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Valgimigli, M.; Bueno, H.; Byrne, R.A.; Collet, J.P.; Costa, F.; Jeppsson, A.; Juni, P.; Kastrati, A.; Kolh, P.; Mauri, L.; et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 213–260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aradi, D.; Komocsi, A.; Vorobcsuk, A.; Rideg, O.; Tokes-Fuzesi, M.; Magyarlaki, T.; Horvath, I.G.; Serebruany, V.L. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.* **2010**, *160*, 543–551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aradi, D.; Storey, R.F.; Komocsi, A.; Trenk, D.; Gulba, D.; Kiss, R.G.; Husted, S.; Bonello, L.; Sibbing, D.; Collet, J.P.; et al. Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 209–215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Breet, N.J.; van Werkum, J.W.; Bouman, H.J.; Kelder, J.C.; Harmsze, A.M.; Hackeng, C.M.; ten Berg, J.M. High on-treatment platelet reactivity to both aspirin and clopidogrel is associated with the highest risk of adverse events following percutaneous coronary intervention. *Heart* **2011**, *97*, 983–990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Alexopoulos, D.; Xanthopoulou, I.; Gkizas, V.; Kassimis, G.; Theodoropoulos, K.C.; Makris, G.; Koutsogiannis, N.; Damelou, A.; Tsigkas, G.; Davlouros, P.; et al. Randomized assessment of ticagrelor versus prasugrel antiplatelet effects in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ. Cardiovasc. Interv.* **2012**, *5*, 797–804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gurbel, P.A.; Erlinge, D.; Ohman, E.M.; Neely, B.; Neely, M.; Goodman, S.G.; Huber, K.; Chan, M.Y.; Cornel, J.H.; Brown, E.; et al. Platelet function during extended prasugrel and clopidogrel therapy for patients with ACS treated without revascularization: The TRILOGY ACS platelet function substudy. *JAMA* **2012**, *308*, 1785–1794. [\[CrossRef\]](#)
- Collet, J.P.; Thiele, H.; Barbato, E.; Barthelmy, O.; Bauersachs, J.; Bhatt, D.L.; Dendale, P.; Dorobantu, M.; Edvardsen, T.; Folliguet, T.; et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 1289–1367. [\[CrossRef\]](#)
- Roule, V.; Ardouin, P.; Repesse, Y.; Le Querrec, A.; Blanchart, K.; Lemaitre, A.; Sabatier, R.; Borel-Derlon, A.; Beygui, F. Point of Care Tests VerifyNow P2Y12 and INNOVANCE PFA P2Y Compared to Light Transmittance Aggregometry after Fibrinolysis. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2018**, *24*, 1109–1116. [\[CrossRef\]](#)
- Procyk, G.; Klimczak-Tomaniak, D.; Sygitowicz, G.; Tomaniak, M. Circulating and Platelet MicroRNAs in Cardiovascular Risk Assessment and Antiplatelet Therapy Monitoring. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1763. [\[CrossRef\]](#)
- Kirschner, M.B.; Kao, S.C.; Edelman, J.J.; Armstrong, N.J.; Valley, M.P.; van Zandwijk, N.; Reid, G. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24145. [\[CrossRef\]](#)
- Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Winter, M.P.; Schneeweiss, T.; Cremer, R.; Biesinger, B.; Hengstenberg, C.; Pruller, F.; Wallner, M.; Kolesnik, E.; von Lewinski, D.; Lang, I.M.; et al. Platelet reactivity patterns in patients treated with dual antiplatelet therapy. *Eur. J. Clin. Investig.* **2019**, *49*, e13102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Willeit, P.; Zampetaki, A.; Dudek, K.; Kaudewitz, D.; King, A.; Kirkby, N.S.; Crosby-Nwaobi, R.; Prokopi, M.; Drozdov, I.; Langley, S.R.; et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 595–600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Landry, P.; Plante, I.; Ouellet, D.L.; Perron, M.P.; Rousseau, G.; Provost, P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 961–966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shi, R.; Zhou, X.; Ji, W.J.; Zhang, Y.Y.; Ma, Y.Q.; Zhang, J.Q.; Li, Y.M. The Emerging Role of miR-223 in Platelet Reactivity: Implications in Antiplatelet Therapy. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 981841. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, Y.Y.; Zhou, X.; Ji, W.J.; Shi, R.; Lu, R.Y.; Li, J.L.; Yang, G.H.; Luo, T.; Zhang, J.Q.; Zhao, J.H.; et al. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin-negative non-ST elevation acute coronary syndrome. *J. Thromb. Thrombolysis* **2014**, *38*, 65–72. [\[CrossRef\]](#)
- Kumar, S.; Kim, C.W.; Simmons, R.D.; Jo, H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: Mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2206–2216. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, X.; Kriegel, A.J.; Jiao, X.; Liu, H.; Bai, X.; Olson, J.; Liang, M.; Ding, X. miR-21 in ischemia/reperfusion injury: A double-edged sword? *Physiol. Genom.* **2014**, *46*, 789–797. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, X.; Sundquist, K.; Svensson, P.J.; Rastkhani, H.; Palmer, K.; Memon, A.A.; Sundquist, J.; Zoller, B. Association of recurrent venous thromboembolism and circulating microRNAs. *Clin. Epigenet.* **2019**, *11*, 28. [\[CrossRef\]](#)
- Barwari, T.; Eminaga, S.; Mayr, U.; Lu, R.; Armstrong, P.C.; Chan, M.V.; Sahraei, M.; Fernandez-Fuertes, M.; Moreau, T.; Barallobre-Barreiro, J.; et al. Inhibition of profibrotic microRNA-21 affects platelets and their releasate. *JCI Insight* **2018**, *3*, 123335. [\[CrossRef\]](#)
- Zampetaki, A.; Willeit, P.; Tilling, L.; Drozdov, I.; Prokopi, M.; Renard, J.M.; Mayr, A.; Weger, S.; Schett, G.; Shah, A.; et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *60*, 290–299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Hromadka, M.; Motovska, Z.; Hlinomaz, O.; Kala, P.; Tousek, F.; Jarkovsky, J.; Beranova, M.; Jansky, P.; Svoboda, M.; Krepelkova, I.; et al. MiR-126-3p and MiR-223-3p as Biomarkers for Prediction of Thrombotic Risk in Patients with Acute Myocardial Infarction and Primary Angioplasty. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chyrchel, B.; Toton-Zuranska, J.; Kruszelnicka, O.; Chyrchel, M.; Mielecki, W.; Kolton-Wroz, M.; Wolkow, P.; Surdacki, A. Association of plasma miR-223 and platelet reactivity in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: A preliminary report. *Platelets* **2015**, *26*, 593–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Simon, L.M.; Edelstein, L.C.; Nagalla, S.; Woodley, A.B.; Chen, E.S.; Kong, X.; Ma, L.; Fortina, P.; Kunapuli, S.; Holinstat, M.; et al. Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood* **2014**, *123*, e37–e45. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**6.3 Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy.**

# Prognostic Implications of Immature Platelet Fraction at 5-Year Follow-up Among ACS Patients Treated With Dual Antiplatelet Therapy

Journal of Cardiovascular  
Pharmacology and Therapeutics  
Vol. 29: 1-8  
© The Author(s) 2024  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/10742484231202864  
journals.sagepub.com/home/cpt



Karolina Gumieźna, MD<sup>1</sup>, Piotr Baruś, MD<sup>1</sup>, Grażyna Sygitowicz, PhD<sup>2</sup>,  
Agnieszka Wiśniewska, PhD<sup>3</sup>, Adrian Bednarek, MS<sup>1</sup>, Jakub Zabłocki, MS<sup>1</sup>,  
Adam Piasecki, MS<sup>1</sup>, Dominika Klimczak-Tomaniak, MD, PhD<sup>4,5</sup>,  
Janusz Kochman, MD, PhD<sup>1</sup>, Marcin Grabowski, MD, PhD<sup>1</sup>,  
and Mariusz Tomaniak, MD, PhD<sup>1</sup> 

## Abstract

**Objective:** Platelets are strongly associated with cardiovascular events due to their role in thrombotic processes. Reticulated platelets have higher prothrombotic potential. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of immature platelet fraction (IPF) in predicting long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods:** This prospective, observational study enrolled patients with ACS treated with dual antiplatelet therapy comprising acetylsalicylic acid and clopidogrel or ticagrelor. The primary outcome was a composite endpoint defined as major adverse cardiovascular events (MACE): all-cause death, myocardial infarction (MI), ischemic stroke, or unplanned revascularization. IPF was determined using flow cytometry in the first 24 h of hospitalization. MACE were evaluated by 2 physicians based on electronic databases and source documentation including discharge letters received from patients upon telephone contact. **Results:** Overall, there were 140 ACS patients (mean age  $65.1 \pm 11.7$ , 37 females [26.4%]) included in this study. Of them, 22.9% had diabetes mellitus, 69.3% hyperlipidemia, 25% had a history of MI. The median IPF values were 2.85 [1.8-4.2] %. Clinical follow-up (median time: 57 months [interquartile range 55-59 months]) was available for 130 patients (92.9%). MACE occurred in 27 patients (20.8%). There were higher rates of MACE at higher IPF tertiles (3rd vs 1st tertile: HR = 5.341 95% CI: 1.546-18.454,  $P = .008$ ). Cox regression analyses showed that IPF level was independently associated with MACE. Time-dependent receiver-operating characteristic curve analysis revealed area under the curve of 0.656 for 5-year outcome with an IPF cutoff point of 3.45% being 63.0% sensitive and 65.0% specific for MACE. **Conclusions:** The study showed IPF may be an independent predictor of long-term mortality and MACE (ClinicalTrials.gov number, NCT06177587).

## Keywords

acute coronary syndrome, dual antiplatelet therapy, immature platelet fraction, reticulated platelets

<sup>1</sup> First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>4</sup> Department of Cardiology, Hypertension and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>5</sup> Department of Immunology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Manuscript submitted: July 27, 2023; accepted: September 4, 2023.

## Corresponding Author:

Mariusz Tomaniak, First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland.

Email: mariusz.tomaniak@wum.edu.pl



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access page (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).



## Introduction

Platelets play a crucial role in the thrombotic processes within the ruptured plaques in coronary arteries, being responsible for one of the main mechanisms of myocardial infarction (MI).<sup>1,2</sup> Reticulated platelets (RPs) are immature platelets, newly released to the circulation, that are usually larger than the mature ones.<sup>3</sup> As they contain mRNA and rough endoplasmic reticulum, they can synthesize proteins; as such their functional potential has been recognized to be more important than that of mature platelets, which would explain their greater reactivity or capacity to aggregate and initiate blood clotting.<sup>4,5</sup> Immature platelet fraction (IPF) is one of the possible indices to describe the level of RPs.<sup>6–8</sup> Calculated as the ratio of RPs to the total platelet count, IPF can serve as a marker for platelet production and turnover.<sup>6–8</sup> With the increased adoption of automated hematology analyzers, it has now become possible to assess IPF levels quickly and inexpensively as part of an extended blood count test, which is a significant advantage enabling IPF measurement to be used as a potential screening test.<sup>9</sup>

Several studies have suggested that RPs can be a good indicator of the effectiveness of dual antiplatelet therapy (DAPT): higher levels of RPs have been associated with an increased risk of thrombotic events whereas lower levels of RPs with better platelet inhibition.<sup>10–12</sup> It was also demonstrated that RPs were increased in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) when compared with healthy controls as well as with other types of acute coronary syndrome (ACS).<sup>13,14</sup> To date, however, the long-term prognostic value of RPs or IPF quantification among patients presenting with ACS has not been elucidated.

The aim of the presented study was to evaluate the effectiveness of IPF levels in predicting long-term clinical outcomes in patients with ACS.

## Methods

This was a prospective, single-center study conducted in the 1st Chair and Department of Cardiology, Medical University of Warsaw. Written informed consent was obtained from each participant included in the study. This study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Collection and management of data was approved by the local medical ethics committee. The clinical trial was registered with ClinicalTrials.gov under the identifier NCT06177587.

### Study Population

A total of 140 patients were recruited between July 2017 and May 2018. The inclusion criteria were age > 18 years, diagnosis of ACS, treatment with antiplatelet therapy and the ability to sign an informed consent. Patients were excluded from the study if their life expectancy was shorter than 1 year or if they received GPIIb/IIIa antagonists in order to isolate the impact of DAPT on patient outcomes depending on IPF. All the patients were treated with 75 mg of acetylsalicylic acid

(ASA) daily and either clopidogrel (75 mg once a day) or ticagrelor (90 mg twice a day). Patients undergoing percutaneous coronary intervention (PCI) received 300 mg of ASA and the loading dose of P2Y<sub>12</sub> inhibitor (either 300 mg of clopidogrel or 180 mg of ticagrelor) periprocedurally. Patients diagnosed with ACS were recruited after coronary angiography and, if applicable, a successful PCI. Consecutive patients who met all inclusion criteria were enrolled.

### Blood Tests

Blood sampling was obtained from peripheral vein in the first 24 h of hospitalization after coronary angiography and, if performed, PCI. In cases where multiple IPF value measurements were accessible from a single patient, the initial available value was selected. Platelet count, hemoglobin, white blood cell count, platelet distribution width, mean platelet volume (MPV) and IPF were assessed in whole blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic (K3EDTA) using an automated hematological analyzer (Sysmex XN 2000, Kope, Japan).

### Follow-up

The primary endpoint was the occurrence of major adverse cardiovascular events (MACE) defined as all-cause mortality, MI, ischemic stroke, or unplanned revascularization. Data was also collected on the cause of death. Cardiovascular (CV) death was defined as sudden cardiac death including unwitnessed death with no conclusive evidence of other than CV cause, fatal MI, death due to heart failure or cardiogenic shock, fatal stroke or other cerebrovascular event, fatal dysrhythmias, pulmonary embolism or other vascular causes. MI was defined according to the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction.<sup>15</sup> The diagnosis of ischemic stroke had to be based on an imaging study (CT scan or MRI) by an experienced neurologist or radiologist. Unplanned revascularization was defined as ischemic-driven urgent hospitalization and PCI or coronary artery bypass grafting due to ischemic symptoms not meeting criteria for MI. If a patient presented with MI and required PCI, the primary endpoint was classified as MI. In case more than one event occurred, the date of the first one was considered. Patients were contacted in December 2022. The researchers who collected follow-up were blinded to all laboratory tests including IPF. Based on the source documentation including discharge letters or electronic records, 2 physicians independently adjudicated an outcome. Mortality was verified via the public registries. Patients or their families if contact with the patient was not possible were contacted via phone to confirm whether they were hospitalized after the index hospitalization for ACS.

### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS Statistics version 28.0 (IBM SPSS, Inc.). Patients were divided into tertiles according to their IPF levels. The normality of distribution

was assessed with Shapiro–Wilk test. Normally distributed variables are presented as mean and standard deviation and compared using analysis of variance. The non-parametric data is presented as median and interquartile range (IQR) and compared with Kruskal–Wallis test. Analyses were stratified according to IPF tertiles. Time-dependent receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis was used to determine the IPF cutoff point that may have predictive value for MACE. Cox regression analysis was performed to assess the association between IPF tertile and MACE. Multivariable Cox regression was performed for IPF treated as a continuous value, as well as for the factors identified with  $P < .1$  at univariate analyses.  $P$ -values  $< .05$  were considered statistically significant.

## Results

A total of 140 patients were enrolled in the study. Ten patients were lost to follow-up despite at least 3 attempts to contact them or their families. The remaining 130 patients (92.9%) were followed up for a median time of 57 months [IQR 55–59 months].

Baseline characteristics by IPF tertiles are presented in Tables 1 and 2. Overall, women constituted almost 30% of all the patients. In the 1st tertile there were 39% of female patients, whereas in the 3rd tertile 14% ( $P = .029$ ). MI prior to the index hospitalization and smoking were more common among patients in the upper tertile. Apart from these differences, only platelet assay parameters (platelet count  $P = .002$ , mean platelet

**Table 1.** Baseline Characteristics.

	All patients (n = 140)	First tertile (n = 46)	Second tertile (n = 47)	Third tertile (n = 47)	P-value
Age, y, mean (SD)	65.1 (11.7)	64.8 (11.2)	65.1 (12.8)	65.5 (11.1)	.953
Female sex, n (%)	37 (26.4)	18 (39.1)	12 (25.5)	7 (14.9)	<b>.029</b>
STEMI, n (%)	78 (55.7)	31 (67.4)	24 (51.1)	23 (48.9)	.147
NSTEMI/UA, n (%)	62 (44.3)	15 (32.6)	23 (48.9)	24 (51.1)	
PCI, n (%)	126 (90.0)	45 (97.8)	38 (80.9)	43 (91.5)	.058
Cardiac risk factors, n (%)					
HT, n (%)	95 (67.9)	27 (58.7)	32 (68.1)	36 (76.6)	.181
DM, n (%)	32 (22.9)	9 (19.6)	12 (25.5)	11 (23.4)	.757
HL, n (%)	97 (69.3)	34 (73.9)	31 (66.0)	32 (68.1)	.675
HF, n (%)	48 (34.3)	15 (32.6)	14 (22.8)	19 (40.4)	.531
Asthma, n (%)	5 (3.6)	3 (6.5)	2 (4.3)	0 (0.0)	.227
COPD, n (%)	8 (5.7)	1 (2.2)	3 (6.4)	4 (8.5)	.408
Peripheral arterial diseases, n (%)	18 (12.9)	6 (13.0)	6 (12.8)	6 (12.8)	.999
CKD, n (%)	19 (13.6)	6 (13.0)	7 (14.9)	6 (12.8)	.948
Current smoker, n (%)	46 (32.9)	13 (28.3)	16 (34.0)	17 (36.2)	.735
Past smoker, n (%)	35 (25.0)	6 (13.0)	13 (27.7)	16 (34.0)	.057
Previous MI, n (%)	35 (25.0)	5 (10.9)	15 (31.9)	15 (31.9)	<b>.026</b>
Previous PCI, n (%)	27 (19.3)	6 (13.0)	12 (25.5)	9 (19.1)	.286
Baseline pharmacotherapy, n (%)					
Statin	137 (97.9)	46 (100.0)	47 (100.0)	44 (93.6)	<b>.048</b>
BB	127 (90.7)	41 (89.1)	41 (87.2)	45 (95.7)	.442
ACEI/ARB	130 (92.9)	43 (93.5)	42 (89.4)	45 (95.7)	.856
CCB	19 (13.6)	6 (13.0)	9 (19.1)	4 (8.5)	.319
PPI	125 (89.3)	42 (91.3)	42 (89.4)	41 (87.2)	.817
Clopidogrel	108 (77.1)	36 (78.3)	35 (74.5)	37 (78.7)	.561
Ticagrelor	32 (22.9)	10 (21.7)	12 (25.5)	10 (21.3)	
Lesion location, n (%)					
MVD	66 (47.1)	19 (6.7)	21 (6.3)	26 (8)	.367
LM	18 (12.9)	7 (15.2)	3 (6.3)	8 (17.0)	.232
LAD	101 (72.1)	32 (69.6)	36 (78.2)	33 (70.2)	.738
Dg	44 (31.4)	18 (39.1)	13 (27.7)	13 (27.7)	.497
Cx	43 (30.7)	22 (47.8)	13 (27.7)	8 (17.0)	<b>.007</b>
Mg	30 (21.4)	11 (23.9)	9 (19.1)	10 (21.3)	.923
RCA	78 (55.7)	23 (50)	26 (55.3)	29 (61.7)	.448
Echocardiography					
EF, %, median (IQR)	49.0 [42.8, 56.0]	48.0 [41.0, 54.5]	51 [45.5, 57.0]	47.0 [43.0, 56.0]	.230

Bold values denote statistical significance at the  $P < .05$  level.

Abbreviations: ACEI/ARB, angiotensin converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers; BB, beta-blockers; CABG, coronary artery by-pass graft; CCB, calcium channel blockers; CKD, chronic kidney disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Cx, the circumflex artery; Dg, diagonal branches of the left anterior descending artery; DM, diabetes mellitus; EF, ejection fraction; HF, heart failure; HL, hyperlipidemia; HT, hypertension; IQR, interquartile range; LAD, the left anterior descending artery; LM, the left main artery; Mg, marginal branches of the circumflex artery; MI, myocardial infarction; MVD, multi-vessel disease; n, number; NSTEMI, non-ST-segment elevation myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention; PPI, proton pump inhibitors; RCA, the right coronary artery; SD, standard deviation; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; UA, unstable angina.

**Table 2.** Laboratory Characteristics.

	Overall (n = 140)	First tertile (n = 46)	Second tertile (n = 47)	Third tertile (n = 47)	P-value
Troponin, ng/mL, median (IQR)	8.9 [1.0, 32.3]	11.2 [1.01, 53.0]	10.3 [1.8, 30.4]	7.6 [0.83, 38.2]	.974
Crea, mg/dL, median (IQR)	1.03 [0.84, 1.23]	1.04 [0.79, 1.20]	0.93 [0.84, 1.22]	1.09 [0.89, 1.28]	.301
GFR, ng/mL, median (IQR)	74.0 [57.0, 91.0]	74.0 [55.5, 87.0]	84.0 [59.0, 95.0]	69.0 [53.0, 84.0]	.256
RBC, 10 <sup>6</sup> /μL, median (IQR)	4.57 [4.11, 4.98]	4.45 [4.07, 4.88]	4.78 [4.38, 5.14]	4.51 [4.01, 4.95]	.059
WBC, 10 <sup>3</sup> /μL, median (IQR)	9.6 [7.8, 13.4]	9.77 [7.54, 12.5]	9.36 [7.8, 13.9]	9.6 [7.7, 13.2]	.956
Neu(%), median (IQR)	69.6 [62.2, 78.2]	68.2 [58.5, 76.8]	71.1 [63.3, 79.5]	69.5 [61.3, 78.2]	.523
Lymph(%), median (IQR)	21.8 [14.2, 29.7]	21.2 [14.7, 33.3]	21.4 [13.2, 28.1]	23.2 [13.8, 28.3]	.889
Mon(%), median (IQR)	8.3 [6.4, 10.4]	8.5 [6.2, 10.0]	7.6 [6.3, 11.2]	8.5 [6.6, 10.4]	.798
Bas(%), median (IQR)	0.3 [0.2, 0.6]	0.3 [0.2, 0.6]	0.3 [0.2, 0.6]	0.3 [0.2, 0.6]	.936
Eos(%), median (IQR)	1.3 [0.7, 2.4]	1.3 [0.3, 2.3]	1.4 [0.3, 2.8]	1.4 [0.7, 2.5]	.689
RDW, %, median (IQR)	13.6 [13.0, 14.4]	14.0 [12.9, 14.9]	13.6 [12.8, 14.4]	13.5 [13.2, 14.3]	.586
HGB, g/dL, median (IQR)	14.1 [12.7, 15.1]	13.8 [12.3, 14.7]	14.5 [13.3, 15.3]	13.8 [12.5, 15.0]	.044
HCT, %, median (IQR)	40.8 [37.3, 43.8]	40.1 [36.0, 42.4]	42.5 [39.2, 44.0]	40.7 [37.3, 44.1]	.093
PLT, 10 <sup>3</sup> /μL, median (IQR)	209 [182, 254]	220 [199, 285]	219 [185, 270]	197 [161, 232]	.002
MPV, fl, median (IQR)	10.2 [9.5, 11.4]	9.8 [9.2, 10.1]	10.4 [9.4, 11.0]	11.5 [10.0, 11.9]	<.001
PDW, fl, median (IQR)	14.2 [11.9, 16.8]	11.9 [11.0, 14.8]	13.5 [12.1, 15.8]	16.4 [14.5, 18.4]	<.001
PCT, %, median (IQR)	0.22 [0.18, 0.27]	0.22 [0.18, 0.27]	0.22 [0.19, 0.27]	0.22 [0.18, 0.26]	.498
P-LCR, %, median (IQR)	32.6 [26.1, 39.7]	25.4 [22.7, 29.2]	31.9 [27.4, 35.5]	39.6 [35.8, 43.9]	<.001
INR, median (IQR)	1.06 [1.01, 1.20]	1.06 [1.00, 1.30]	1.08 [1.01, 1.20]	1.04 [1.00, 1.12]	.476
AST, U/l, median (IQR)	34.0 [23.0, 80.0]	31.0 [21, 109.5]	33.0 [22.5, 67.0]	39.0 [24.5, 72.0]	.862
ALT, U/l, median (IQR)	30.0 [23.0, 48.0]	30.0 [21.0, 40.0]	31.0 [23.0, 43.0]	37.0 [27.0, 54.5]	.267
CRP, mg/L, median (IQR)	3.65 [1.6, 13.5]	5.0 [2.0, 15.2]	3.3 [1.2, 11.1]	4.2 [1.7, 15.3]	.457
Cholesterol, mg/dl, mean (SD)	171.1 (42.7)	176.4 (45.4)	173.3 (44.0)	163.3 (38.0)	.334
HDL, mg/dL, median (IQR)	43.0 [35.0, 51.0]	43.0 [34.0, 50.5]	44.0 [36.0, 52.5]	43.0 [33.0, 54.0]	.928
LDL, mg/dl, mean (SD)	96.0 (35.5)	101.2 (39.4)	97.3 (39.1)	89.3 (26.4)	.308
TG, mg/dL, median (IQR)	117 [92, 153]	113 [87, 156]	114 [94, 156]	121 [86, 146]	.998

Bold values denote statistical significance at the  $P < .05$  level.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; Bas, basophils; Crea, creatinine; Eos, eosinophils; GFR, glomerular filtration rate; HCT, hematocrit; HDL, high-density lipoprotein; HGB, hemoglobin; INR, international normalized ratio; LDL, low-density lipoprotein; Lymph, lymphocytes; Mon, monocytes; MPV, mean platelet volume; Neu, neutrophils; PCT, procalcitonin; PDW, platelet distribution width; P-LCR, platelet large cell ratio; PLT, platelets; RBC, red blood cells; RDW, red cell distribution width; TG, triglycerides; WBC, white blood cells.

**Table 3.** Follow-up.

	First tertile (IPF < 2.2%) n = 43	Second tertile (IPF 2.2-3.6%) n = 42	Third tertile (IPF ≥ 3.7%) n = 45	Overall n = 130
Death	2 (4.7%)	4 (9.5%)	9 (20.0%)	15 (11.5%)
MI	1 (2.3%)	4 (9.5%)	2 (4.4%)	7 (5.4%)
Revascularization	0	1 (2.4%)	3 (6.7%)	4 (3.1%)
Stroke	0	0	1 (2.2%)	1 (0.8%)
Overall	3 (7.0%)	9 (21.4%)	15 (33.3%)	27 (20.8%)

Abbreviations: IPF, immature platelet fraction; MI, myocardial infarction.

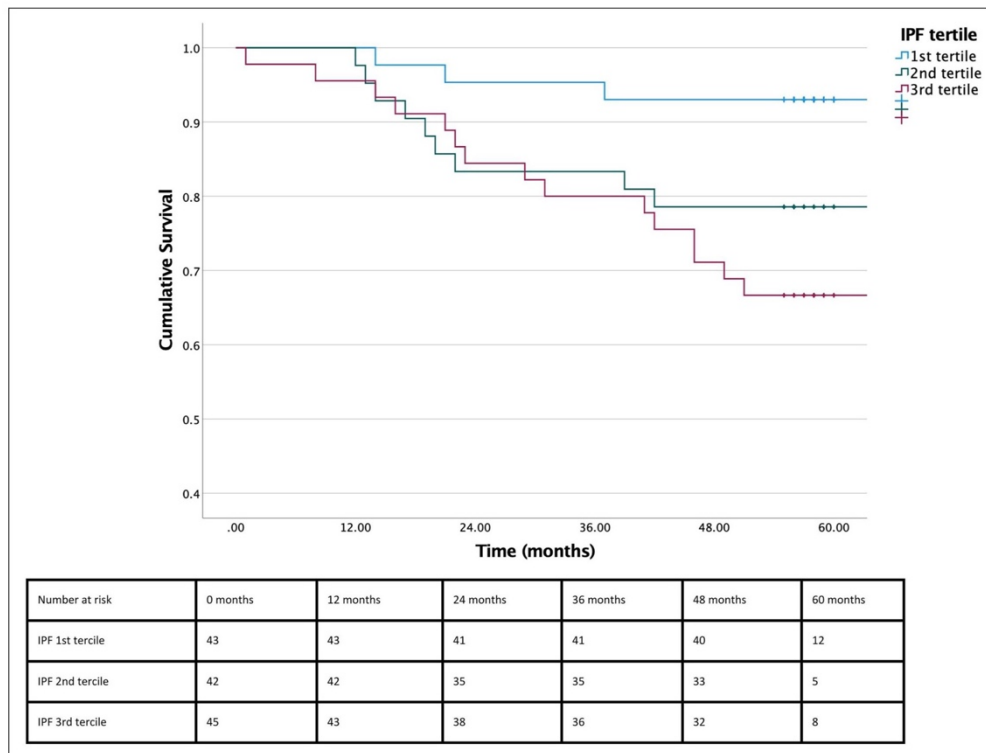
volume  $P < .001$ , platelet distribution width  $P < .001$ , platelet large cell ratio  $P < .001$  differed significantly between groups. All patients received DAPT, of which 108 (77.1%) were given clopidogrel and 32 (22.9%) ticagrelor. The recruited patients were not using glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.

All patients were diagnosed with ACS. Among them, 78 (55.7%) presented with STEMI and 62 (44.3%) with NSTEMI (non-ST-segment elevation myocardial infarction) or UA (unstable angina). 126 (90%) patients had PCI performed. Overall MACE occurred in 27 patients (20.8%). Patients in the highest tertile had 1.7 times higher relative risk of MACE than patients in the middle tertile, and 4.9 times higher than patients in the lowest tertile. Follow-up events in

each IPF tertile are presented in Table 3. The main cause of death was CV mortality and it occurred in 14 patients (93.3%).

Cox proportional hazard model for MACE revealed a significant difference in the occurrence of MACE in the highest compared to the lowest tertile (HR = 5.341 95% CI: 1.546-18.454,  $P = .008$ ). The risk of MACE was also higher in patients in the middle tertile when compared to the lowest tertile, but it did not reach statistical significance (HR = 3.395 95% CI: 0.919-12.543,  $P = .067$ ). The survival Kaplan-Meier curve for each tertile is presented in Figure 1. Time-dependent ROC curve analysis revealed AUC of 0.656 for 5-year outcome with an IPF cut point of 3.45% being 63.0% sensitive and 65.0% specific for MACE (Figure 2).





**Figure 1.** Kaplan–Meier event free survival curve with follow-up duration of 5 years after acute coronary syndrome. Blue, green, and red lines represent 1st, 2nd, and 3rd immature platelet fraction (IPF) tertiles, respectively. The numbers in the table below the graph represent the number of patients at risk at 0, 12, 24, 36, 48, and 60 months. Log rank  $P = .013$ .

Multivariable Cox regression analyses showed that baseline IPF level was independently associated with MACE (HR = 1.279, 95% CI: 1.056–1.549,  $P = .012$ ). Other tested variables did not reach statistical significance. Results are presented in Table 4.

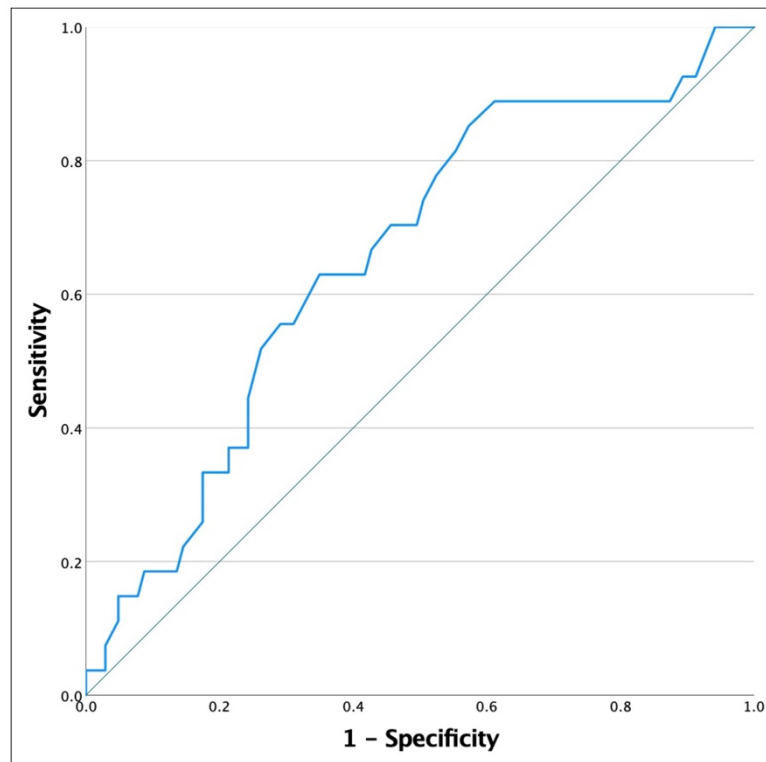
In order to evaluate the importance of particular drugs, the analysis inside subgroups receiving various P2Y12 inhibitors was also designed. Similarly to the overall study population, Cox regression analysis further confirmed a significantly higher risk of MACE in patients in the highest versus lowest IPF tertile in clopidogrel-treated cohort (HR 6.25 CI: 1.4–27.7,  $P = .016$ ), while no statistical significance was achieved in the ticagrelor-treated group despite the numerically higher risk (HR 3.54 CI: 0.37–34.03,  $P = .274$ ).

## Discussion

To the best knowledge of the authors, the presented study was the first study with such a long-term follow-up to assess the relationship between IPF level and the risk of MACE in patients who presented with ACS and were treated with DAPT. We

demonstrated that the higher IPF values were associated with significantly increased occurrence of MACE, corroborating the preliminary findings of prior reports with shorter observation.

Platelets are known to contribute to the complex and multifactorial pathomechanism of CV events.<sup>16,17</sup> Their younger fraction, namely RPs, may reflect underlying disturbances in the process of platelet production, maturation and clearance, which can lead to an increased risk of thrombosis.<sup>18,19</sup> The hyperreactivity of RPs could be one of the possible explanations for the increased risk of CV events in patients with higher IPF values. In research involving patients with ACS receiving DAPT (aspirin and clopidogrel), it was found that individuals with a high platelet turnover, indicated by a larger number of RPs, experienced a significant reduction in the effectiveness of the antiplatelet treatment.<sup>6</sup> The findings were confirmed in different patients' groups, also treated with prasugrel.<sup>12</sup> One may suggest that the impaired response to DAPT associated with increased baseline IPF may be one of the factors underlying the increased risk of subsequent CV events.



**Figure 2.** Receiver-operating characteristic curve for prediction of major adverse cardiovascular events based on the immature platelet fraction (IPF) levels.

**Table 4.** Multivariable Cox Regression.

	Hazard ratio	P-value	CI95%
IPF	1.279	<b>.012</b>	1.056-1.549
Gender	0.702	.540	0.227-2.172
Past smoker	1.348	.482	0.587-3.097
Previous MI	1.183	.703	0.500-2.798
Hemoglobin	0.948	.682	0.732-1.227
Statins	0.908	.928	0.113-7.325
RBC	1.012	<b>.848</b>	0.895-1.144

Bold values denote statistical significance at the  $P < .05$  level.

Abbreviations: CI95%, 95% confidence interval; IPF, immature platelet fraction; MI, myocardial infarction; RBC, red blood cells.

It is presumed that RPs may affect ADP-induced platelet aggregation in patients on therapy with thienopyridines. Bongiovanni et al investigated the existence of an association of high IPF with high MACE risk in patients treated with either prasugrel or ticagrelor. In addition, the association of IPF with ADP-induced platelet aggregation was compared. The risk of MACE was higher in patients with elevated IPF values regardless

of the drug used, yet the association between ADP-induced platelet aggregation and IPF existed only in patients treated with prasugrel.<sup>20</sup> Another important feature of RPs is their ability to produce cyclooxygenase 2 (COX-2). Increased COX2 makes low doses of ASA insufficient to inhibit thromboxane production, and thus the risk of thrombotic events is reportedly higher despite proper intake of the medications.<sup>21</sup> The phenomena outlined above seem to partially explain our findings, however, further research is needed to fully understand the potential mechanism of RPs in predicting adverse CV events.

We observed that the risk of MACE in patients with IPF  $\geq 3.7\%$  was 4.9 times higher as compared with the group in the lowest tertile of IPF, that is,  $<2.2\%$ . Our finding is consistent with previously conducted research with shorter follow-up time. It was first shown in 2013 by Cesari et al that RPs can predict CV death in ACS patients in 1-year follow-up with optimal cutoff point of 3.3%. This is similar to the value obtained in our study (3.45%). However, both the previous and our study showed unsatisfactory sensitivity (63.6% and 63.0%, respectively) and specificity (61.8% and 65.0%, respectively).<sup>22</sup> Another study by Freynhofer et al performed on a

greater number of patients undergoing PCI also showed association between IPF level and the risk of MACE with the cutoff point at 3.35% in 6-month follow-up.<sup>23</sup> The other parameters dependent from the number of RPs were also identified as predictors of MACE including immature platelet count (IPC)<sup>24</sup> and mean platelet volume (MPV).<sup>23</sup>

The studies presented above differ from ours in terms of early mortality or MACE rate. Cesari et al showed that there was a significant difference in survival rate early after the incident, which was not observed in our population. However, it should be pointed out that the mortality rate in the first year was generally higher in that study. It may be due to multiple factors, the most important of which we find much higher mean age of patients included in the previous research, that is, 11 years difference in overall population. Moreover, in the group with CV death the mean age was 87 years, being significantly different than in no CV death group and over 20 years higher than in our population. Furthermore, in our study, a higher percentage of patients received optimal therapy including ACE-inhibitor and statin (92.9% and 97.9%, respectively, in our study vs 26.2% and 20.5% in the previously described). Ibrahim et al on the other hand presented similar results for the 1-month MACE, yet the difference between low and high IPC groups also occurred earlier. However, the inclusion criteria in that study were more liberal including both ACS and CCS patients. Therefore, the treatment differed, meaning only 33% of patients were treated with stent implantation. Also, the median baseline IPF value in that study was higher than in ours (4.3% vs 2.85%, respectively). That is consistent with the findings of IPF's predictive value. Knowledge regarding the relationship between RP levels and early complications of ACS is sparse. Previous works evaluated the association between IPF and MACE over various observation periods, from 6 to about 30 months.<sup>20,22-24</sup> However, studies assessing the early risk of complications after ACS in relation to MACE are lacking. Studies also suggest that the risk of CV complications after cardiac surgery is higher for higher IPF values.<sup>25</sup> Therefore, the aspect of the relationship between IPF and early complications is a gap in knowledge that should be addressed.

CAD is the most common type of heart disease, causing hundreds of millions of deaths each year.<sup>26</sup> As the response to antiplatelet therapy is not identical, it is believed that there should be a personalization of treatment including the choice of drug, the duration of treatment and the dosing. Some evidence exists that identifying patients with higher bleeding or ischemic risk among patients treated with antiplatelet therapy using genetic testing or advanced methods determining platelet activity was beneficial,<sup>27</sup> though it is not recommended in routine clinical practice, partially considering its costs. Taking into account the lack of effective and accessible methods to select patients requiring intensified treatment, IPF appears to be a potentially useful marker to identify the individuals at an increased risk of ischemic events. Further research powered for clinical outcomes in that field is warranted.

The presented study should be viewed at in light of the following limitations. First, the method of collecting follow-up by

interviewing patients or their families by telephone calls carries the risk of bias. However, we made every effort to verify the information obtained as far as possible by confirming death records in a public database and reviewing information on all hospitalizations due to MACE in the source documentation. Second, despite the accurate and reliable collection of patient medical history, the existence of unidentified confounders cannot be excluded. Moreover, the ratio of conservatively treated patients compared to the invasively managed group does not allow a comparison of the predictive value of IPF in the 2 groups and would require the collection of a larger cohort. The low event rate in the first few months could also be viewed as a limitation, not providing the insights into the impact of IPF on early mortality and MACE. Finally, the population was relatively small. Further studies on a larger cohort are warranted to confirm presented findings. Future research should focus on understanding of potential value of therapy intensification among patients identified with higher IPF values. In addition, studies to date have primarily assessed baseline IPF values, while it may be necessary to assess the variability of this parameter over time and in relation to the treatment used in different patients' groups.

## Conclusions

IPF may be an independent predictor of long-term mortality and MACE in patients with ACS treated with DAPT. Its accessibility and ease of assessment by flow cytometry may facilitate its more common use in CV risk assessment in this group of patients, provided its accuracy is proven on a larger population.

## Author Contributions

All authors contributed to the study conception and design. M.T., K.G., G.S., and A.W. contributed to methodology; M.T. G.S., and D.K.T. contributed to validation; A.B. and K.G. contributed to formal analysis; K.G., P.B., J.Z., and A.P. contributed to investigation and data collection; K.G., A.B., J.Z., and M.T. contributed to writing the original draft preparation; K.G., G.S., D.K.T., M.G., J.K., and M.T. contributed to writing the review and editing; K.G., A.B., and J.Z. contributed to visualization; M.T., J.K., and M.G. contributed to supervision. All authors edited and approved the final version of the manuscript.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Ethics Approval

This study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Collection and management of data was approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw.

## Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

## ORCID iD

Mariusz Tomaniak  <https://orcid.org/0000-0003-0966-3313>

## References

- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*. 1996;93(2):229–237.
- Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):498–511.
- Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol*. 1995;23(9):996–1001.
- Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"—more than just vestigial mRNA! *Platelets*. 2008;19(6):395–404.
- Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets*. 1997;8(6):379–383.
- Cesari F, Marcucci R, Caporale R, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008;99(5):930–935.
- Grove EL, Hvas AM, Mortensen SB, Larsen SB, Kristensen SD. Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):185–191.
- Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*. 1990;75(1):116–121.
- Buttarelli M, Plebani M. Automated blood cell counts: State of the art. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(1):104–116.
- Wurtz M, Grove EL, Wulff LN, et al. Patients with previous definite stent thrombosis have a reduced antiplatelet effect of aspirin and a larger fraction of immature platelets. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3(8):828–835.
- Verdoia M, Pergolini P, Rolla R, et al. Impact of long-term dual antiplatelet therapy on immature platelet count and platelet reactivity. *Angiology*. 2018;69(6):490–496.
- Bemlochner I, Goedel A, Plischke C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2015;36(45):3202–3210.
- Lakkis N, Dokainish H, Abuzahra M, et al. Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(10):2091–2093.
- Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):151–156.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2019;40(3):237–269.
- Khodadi E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules. *Cardiovasc Toxicol*. 2020;20(1):1–10.
- Hille L, Lenz M, Vlachos A, et al. Ultrastructural, transcriptional, and functional differences between human reticulated and non-reticulated platelets. *J Thromb Haemost*. 2020;18(8):2034–2046.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*. 2009;84(2):102–108.
- Gao XP, Liu ZM, Li J, Han XY. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in essential thrombocythemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2006;14(1):165–167.
- Bongiovanni D, Schreiner N, Gosetti R, et al. Immature platelet fraction predicts adverse events in patients with acute coronary syndrome: the ISAR-REACT 5 reticulated platelet substudy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(2):e83–e93.
- Guthikonda S, Lev EI, Patel R, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*. 2007;5(3):490–496.
- Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-florence 2 study. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):846–853.
- Freyenhofer MK, Iliev L, Bruno V, et al. Platelet turnover predicts outcome after coronary intervention. *Thromb Haemost*. 2017;117(5):923–933.
- Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, DeLao T, Barker CM, Kleiman NS. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(20):2122–2129.
- Imperiali CE, Lopez-Delgado JC, Dastis-Arias M, Sanchez-Navarro L. Biomarker evaluation for major adverse cardiovascular event development in patients undergoing cardiac surgery. *Adv Lab Med*. 2020;1(4):20200031.
- Ralapanawa U, Sivakanesan R. Epidemiology and the magnitude of coronary artery disease and acute coronary syndrome: a narrative review. *J Epidemiol Glob Health*. 2021;11(2):169–177.
- Galli M, Benenati S, Capodanno D, et al. Guided versus standard antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2021;397(10283):1470–1483.

## **6.4 Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring.**



## Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring

Karolina Gumieźna<sup>1\*</sup>, Piotr Baruś<sup>1\*</sup>, Grażyna Sygitowicz<sup>2</sup>,  
 Agnieszka Wiśniewska<sup>3</sup>, Dorota Ochijewicz<sup>1</sup>, Karolina Pasierb<sup>1</sup>,  
 Dominika Klimczak-Tomaniak<sup>4,5</sup>, Ewa Kuca-Warnawin<sup>6</sup>, Janusz Kochman<sup>1</sup>,  
 Marcin Grabowski<sup>1</sup>, Grzegorz Opolski<sup>1</sup>, Mariusz Tomaniak<sup>1</sup>, Krzysztof J. Filipiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Department of Laboratory Diagnostics, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>4</sup>Department of Cardiology, Hypertension and Internal Medicine,  
 Medical University of Warsaw, Poland

<sup>5</sup>Department of Immunology, Transplantation and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>6</sup>Department of Pathophysiology and Immunology, National Institute of Geriatrics,  
 Rheumatology and Rehabilitation, Warsaw, Poland

### Abstract

*Immature platelet fraction (IPF), circulating platelets still containing RNA, can be easily calculated by automated flow cytometry, this makes them an accessible biomarker. Higher IPF concentrations were reported in patients with thrombocytopenia, patients who were smokers, and also those who were diabetics. Several studies have reported their diagnostic and prognostic importance in patients presenting with acute coronary syndromes, especially ST-segment elevation myocardial infarction, where increased IPF level is an independent predictor of cardiovascular death. In addition, higher IPF were reported in patients with inadequate response to either clopidogrel or prasugrel, suggesting their potential role in antiplatelet therapy monitoring. Their prognostic significance was also observed in both coronary artery disease and postcardiac surgery status, where their higher levels correlated with the risk of major adverse cardiac events.*

*The current review aims to present the current evidence on diagnostic, prognostic and potentially therapeutic roles of IPF in cardiovascular medicine. (Cardiol J 2023; 30, 5: 817–824)*

**Key words:** immature platelet fraction, antiplatelet therapy monitoring, acute coronary syndromes

### Introduction

Platelet circulation is held in balance between production and usage. Around 12% of circulating platelets are replaced every 24 hours to keep hemostasis. The production of platelets is controlled

by many different factors, with thrombopoetin and interleukin 6 being the two most important ones [1–13]. When the demand for platelets is high, megakaryocytes in bone marrow release their higher amount into circulation. This can liberate a pool of immature platelets which are also called

Address for correspondence: Mariusz Tomaniak, MD, PhD, First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1A, 02–097 Warszawa, Poland, tel: +48 602 699 078, e-mail: mariusz.tomaniak@wum.edu.pl

Received: 15.04.2022

Accepted: 9.12.2022

Early publication date: 10.03.2023

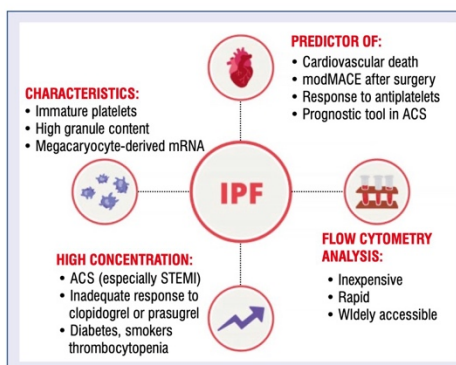
\*The authors equally contributed to the manuscript as first authors.

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

reticulated platelets. They differ considerably from the mature version — are larger in size and contain messenger RNA (mRNA) in their cytoplasm. This means they are able to synthesize protein. Moreover, immature platelets contain a lot of dense granules. All of this leads to being more enzymatically and metabolically active, which results in the aggravated prothrombotic potential. Immature platelet fraction (IPF) represents the percentage of the youngest circulating platelets still containing RNA in peripheral blood. This promising biomarker has many advantages including a relatively low price (around \$10 per test), the feasibility of quick testing (depends on laboratory logistics and the organization, normally around 8 h) and determination by flow cytometry or an automated hematology analyzer [1–13]. However, flow cytometry cannot rule out the nonspecific marking of other granulate components. Fully automated methods allow for more precise count of the IPF. The values obtained depend not only on the method, but also on the source and concentration of fluorochrome and the protocol that is used. Therefore, if they were to be used in clinical practice, there is a need for further standardization of the method that would be both reliable and accessible [14]. IPF is elevated in conditions with rapid platelet destruction i.e., immune thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation [15]. Furthermore, higher number of IPF was observed in patients suffering from gestational hypertensive disorders compared with the control group [16]. Raised values of this parameter were documented in patients with septic shock and correlated with severity scores [17]. Recently, elevated number of IPF was observed in patients with acute myocardial infarction, especially in the acute phase of ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) [18]. The objective of this review is to summarize the current state of knowledge regarding the diagnostic and prognostic significance of IPF in various cardiological conditions, with particular focus on acute coronary syndromes (ACS), chronic coronary syndromes, and their pharmacological management. The advantages and possibilities of introducing this biomarker are summarized in Central illustration.

### IPF in acute coronary syndromes

Grove et al. [18] were first to hypothesize that IPF may contribute to coronary thrombus formation. Their study investigated IPF levels in: 22 healthy subjects, 39 patients with stable coronary artery disease (CAD), and 359 patients with ACS.



**Central illustration.** An outline of the most important information about immature platelet fraction (IPF); ACS — acute coronary syndrome; modMACE — major adverse cardiovascular events, deep vein thrombosis or pulmonary embolism during hospital stay; STEMI — ST-segment elevation myocardial infarction.

IPF levels proved elevated: in patients with CAD compared to healthy subjects, in ACS, especially in STEMI. Further, it was observed that IPF levels were higher by 18% in smoking individuals, compared with non-smokers, and IPF was elevated by 16% in diabetics, compared with non-diabetics [18].

Cesari et al. [19] investigated IPF as a predictor of cardiovascular death in ACS. 229 patients were enrolled (125 with STEMI and 104 with non-STEMI/unstable angina). The study group also was analyzed for highly immature platelet fraction (H-IPF). At 1-year follow-up 22 (9.6%) patients died from cardiovascular causes. Those patients presented elevated levels of IPF ( $p = 0.05$ ) and H-IPF ( $p = 0.006$ ) compared to the alive. Optimal cut-off values for the prediction of cardiovascular death were presented: IPF  $\geq 3.3\%$  and H-IPF  $\geq 0.9\%$  (Table 1) [19].

### IPF in coronary artery disease

It has been proven that increased platelet consumption is present in patients suffering from CAD [20]. Furthermore, high levels of IPF are correlated positively with elevated residual platelet aggregation in patients with CAD receiving antiplatelet therapy [21–23].

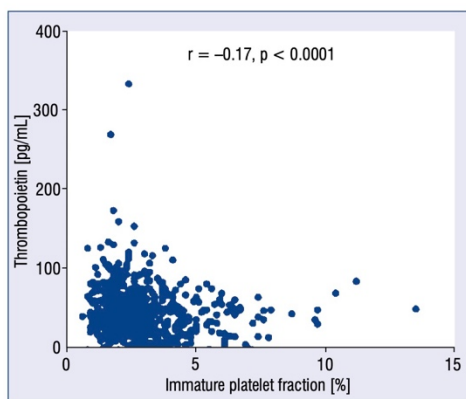
A study from 2014 by Larsen et al. [24] investigated correlations between platelet turnover parameters (including IPF), thrombopoietin and

**Table 1.** A summary of studies regarding immature platelet fraction in cardiovascular diseases.

Study	Population (n)	Intervention	Comparison	Outcomes
<b>ACS</b>				
Cesari et al. [19]	229	PCI	IPF parameters among ACS patients and after 1-year follow-up	After one-year follow-up, IPF and H-IPF were increased in patients who died from cardiovascular causes
<b>CAD</b>				
Verdoia et al. [13]	1789	Coronary angiography	Correlation between IPF and the rate of CAD or severe left main/ /three vessel-disease	IPF parameter should not be overlooked as a marker of coronary atherosclerosis among patients with CAD undergoing coronary angiography
Grove et al. [22]	177	75 mg of plain ASA daily	Correlation between platelet turnover and platelet aggregation in ASA-treated patients	IPF reflects increased platelet turnover in patients with CAD. Increased platelet turnover may render ASA less effective in patients with CAD
Guthikonda et al. [23]	90	Elective cardiac catheterization and/or planned PCI	Correlation between size of platelets and response to antiplatelet therapy	The size proportion of circulating IPF affect response to antiplatelet therapy in patients with stable CAD
Larsen et al. [24]	581	75 mg of ASA daily	Correlation between IPF, IPC, MPV, PC, PDW, P-LCR, and thrombopoietin	Increased IPF, MPV, PDW in stable CAD patients, indicate increased platelet turnover. The inverse relation between thrombopoietin and IPF, IPC, MPV, PDW and P-LCR
Ibrahim et al. [28]	89	Observational study	Correlation between the IPC and IPF and MACE	Both the IPF and the IPC were greater in patients with MACE at follow-up
Cesari et al. [29]	372	PCI and DAPT	Influence of IPF on platelet activity	↑ IPF and H-IPF in ACS patients Positive correlation between PA, IPF, H-IPF and MPV IPF influences the risk of RPR
<b>Therapy ACS</b>				
Funck-Jensen et al. [30]	48 STEMI patients	PCI and DAPT with ASA + clopidogrel	IPF levels prior to PCI, 4–12 h after loading doses of ASA and clopidogrel, and 3 months later	↑ IPF in acute phase of STEMI
Bernlochner et al. [34]	124 ACS patients	PCI and DAPT with ASA + either ticagrelor or prasugrel	Correlation of platelet aggregation and IPF in ticagrelor- vs. prasugrel-treated patients P-selectin expression in immature platelets vs. in the mature platelets	Prasugrel: PA correlated with IPF Ticagrelor: no correlation ↑ P-selectin in IPF P-selectin in immature platelets on prasugrel vs. ticagrelor
Fabbri et al. [35]	101 ACS male patients divided in subgroups: persistent, non-persistent and late HPR	PCI and DAPT with ASA and clopidogrel	Evaluation of HPR	↑ IPF in late HPR patients
<b>Therapy</b>				
Ibrahim et al. [41]	29 healthy subjects divided into tertials based on baseline IPF	75 mg/day of clopidogrel for a week	Platelet aggregation in response to 2, 5 and 20 mM of ADP	Baseline PA similar in all tertials ↑ PA in response to 5 mM of ADP after a week of clopidogrel in the upper vs. the lower tertial
Wurtz et al. [42]	117	Previous PCI, treated with ASA 75 mg/day	Platelet aggregation and IPF in patients with vs. without ST	Significantly ↑ PA and not statistically significant (p = 0.13) IPF in patients with ST
<b>Post cardiac surgery</b>				
Anetsberger et al. [43]	696	Intermediate or high-risk non-cardiac surgery	Pre- and postoperative IPF level in patients with vs. without modMACE	No differences preoperatively ↑ IPF in modMACE patients in the PACU

ACS — acute coronary syndrome; ADP — adenosine diphosphate; ASA — acetylsalicylic acid; CAD — coronary artery disease; DAPT — dual antiplatelet therapy; H-IPF — highly immature platelet fraction; HPR — high on-treatment platelet reactivity; IPC — immature platelet count; IPF — immature platelet fraction; MACE — major adverse cardiovascular events; modMACE — MACE, deep vein thrombosis or pulmonary embolism during hospital stay; MPV — mean platelet volume; PA — platelet aggregation; PACU — post anesthesia care unit; PC — platelet count; PCI — percutaneous coronary intervention; PDW — platelet distribution width; P-LCR — platelet large cell ratio; RPR — residual platelet reactivity; ST — stent thrombosis; STEMI — ST segment elevation myocardial infarction





**Figure 1.** Thrombopoietin concentration and immature platelet fraction values (adapted from: [24]).

low-grade inflammation in stable, high-risk CAD patients receiving low dose of acetylsalicylic acid (ASA; 75 mg once a day) during a mono antiplatelet therapy. 581 patients, who had angiographically documented CAD were enrolled [24]. Positive moderate-to-strong correlations were found between IPF, immature platelet count (IPC), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW) and platelet larger cell ration (P-LCR). This study observed that thrombopoietin levels were inversely correlated with the values of IPF (Fig. 1). A negative correlation was also observed between IPF and microRNA (miR) 423-3p in patients with high-risk CAD, suggesting that these miRs may play a role in platelet turnover [25]. Studies have shown that higher MPV is positively correlated with a higher mortality rate among patients suffering from stable CAD, thus IPF can significantly contribute to this factor [26]. Larger platelets are also associated with early stent thrombosis in patients with ACS treated by percutaneous coronary intervention (PCI) [27].

Furthermore, IPF levels of above 6% were associated with increased age, this is consistent with the study performed by Cesari et al. [19], which also showed that low grade inflammation does not have a significant impact on platelet turnover parameters, including IPF [24].

Immature platelet fraction is considered to be a potential biomarker of platelet activity and major cardiovascular events. A study by Verdoia et al. [13] from 2017 investigated the correlation between IPF and the extent of CAD in

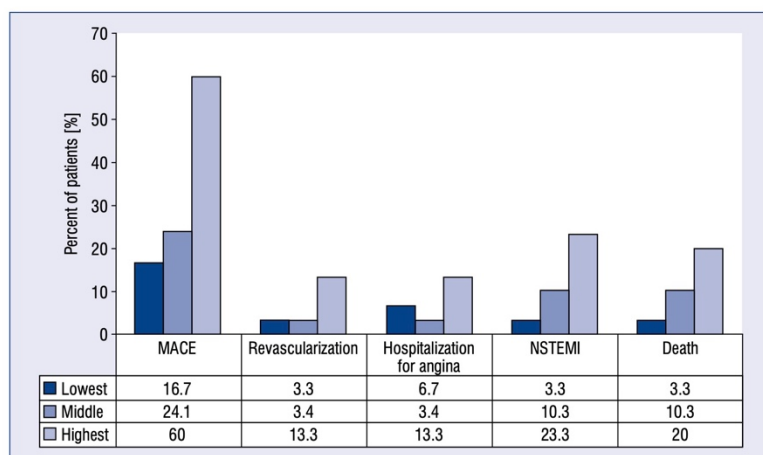
patients who underwent coronary angiography. 1789 patients were enrolled and divided into quartiles based on the levels of IPF. Between quartiles there was no significant correlation in angiography, however, a low degree of thrombolysis in myocardial infarction flow ( $p = 0.01$ ) and lesions involving bifurcations ( $p = 0.05$ ) correlated positively with higher values of IPF. This shows that IPF is not associated with the extent of CAD. On the other hand, this study showed that IPF is higher in: smoking patients ( $p = 0.02$ ), in patients with higher levels of hemoglobin ( $p < 0.001$ ), in patients with higher levels of uric acid ( $p < 0.001$ ), and in patients with a lower platelet count ( $p = 0.003$ ) [13].

Immature platelet fraction can be used as a prognostic marker for major adverse cardiovascular events (MACE) in patients with CAD. MACE was defined as all cause mortality, myocardial infarction, unplanned revascularization, or hospitalization for angina. 89 patients were enrolled and followed up for a median of 31 months. IPF was higher in patients who suffered MACE, as compared to patients without any events at the follow up (5.3 [4.3–6.4] vs. 3.7 [3.0–5.1],  $p = 0.007$ ) (Fig. 2) [28].

In another study from 2008 performed by Cesari et al. [29] IPF was used for the assessment of platelet reactivity in CAD patients on dual antiplatelet therapy (DAPT). 372 patients were enrolled, IPF was measured using a hematology analyzer and platelet function by optical platelet aggregometry (PA) on platelet-rich-plasma induced by 1 mmol arachidonic acid (AA-PA) and 10 microM ADP (ADP-PA). Residual platelet reactivity was defined as either AA-PA  $> 20\%$  or ADP-PA  $> 70\%$ . Significant positive correlations were found between IPF and PA, MPV. Furthermore, the higher the IPF the greater platelet aggregation by AA and ADP. Moreover, a significant diversity for IPF between patients with and without residual platelet reactivity was proven and therefore IPF influences the risk of residual platelet reactivity. This study suggested that high platelet turnover is a mechanism connected with platelet reactivity in high-risk CAD on dual antiplatelet therapy [29].

### IPF in therapy for acute coronary syndrome

Funck-Jensen et al. [30] sought to evaluate IPF levels in patients suffering from ACS and receiving dual antiplatelet therapy (clopidogrel and ASA). 48 STEMI patients were enrolled. Patients had their blood tested prior to PCI, at 4 to 12 hours after



**Figure 2.** Outcome events stratified by immature platelet fraction tertile (adapted from: [28]); MACE — major adverse cardiovascular events; NSTEMI — non-ST-segment elevation myocardial infarction.

administration of bolus doses, and at follow-up after 3 months. Each patient was given loading doses of ASA (300 mg) and clopidogrel (600 mg) orally in the ambulance. In the acute phase of STEMI at the time prior to PCI platelet aggregation was higher compared to 4 and 12 hours after administration of loading doses of clopidogrel and ASA ( $p < 0.01$ ). Furthermore, IPF values were significantly elevated in the acute phase of STEMI compared to 3 months afterwards ( $p < 0.0001$ ). This proves that platelet aggregation is much higher in the acute phase of STEMI even though patients were given loading doses of antiplatelet drugs. This can be explained by a high platelet turnover during the acute phase of STEMI which results in an impaired response to clopidogrel and ASA [30].

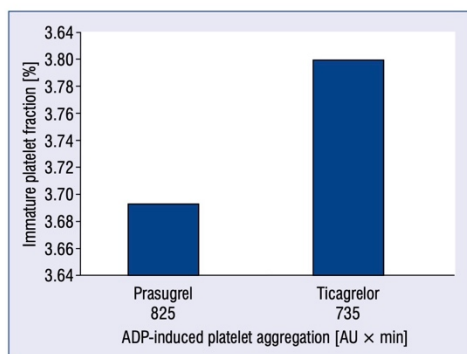
Moreover, a study performed on 100 patients with STEMI or non-STEMI showed, that IPF levels tend to decline during a day after a successful PCI ( $p < 0.001$ ) and remain stable over the first month [31]. It also revealed, that high IPF levels correlate with increased troponin levels ( $p = 0.001$ ), which might be a ground for future studies to exploit another feature of the IPFs, as the troponin level was shown to correlate with infarct size [32, 33].

Current trends aim at a personalized antiplatelet therapy. IPF may be a vital marker for choosing a P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitor and defining the optimum time interval of drug administration. The primary difference between ticagrelor and thienopyridines

i.e., prasugrel is a reversible binding of the P2Y<sub>12</sub> receptor. The hypothesis arises that IPF may respond poorly to therapy with ticagrelor compared to therapy with prasugrel. Bernlochner et al. [34] assessed the influence of IPF on ADP-induced platelet aggregation in ACS patients treated with either prasugrel or ticagrelor. 124 patients were enrolled, all of whom received ticagrelor or prasugrel loading doses prior to PCI and a continuation of either drug for 12 months as well as ASA in a dual antiplatelet strategy. Venous blood was obtained before drug administration and 6 to 48 hours after application of a loading dose of studied drugs [34].

The study showed ADP-induced platelet aggregation was significantly lower in patients treated with prasugrel than with ticagrelor ( $p = 0.001$ ) [34]. Furthermore, in prasugrel treated patients, the platelet aggregation correlated positively with IPF ( $p < 0.001$ ). On the other hand, no such correlation was observed in ticagrelor treated patients ( $p = 0.51$ ) (Fig. 3) [34].

Additionally, this study aimed to assess the expression of P-selectin as a marker for platelet activation in immature platelets versus in mature platelets. A subgroup of the study population ( $n = 28$ ,  $n = 15$  prasugrel treated patients,  $n = 13$  ticagrelor treated patients) was enrolled for this test. ADP-induced P-selectin expression was measured in the dependence of the time point of drug administration. Whole blood was analyzed at two different time points, the first — 2 hours after the last dose,



**Figure 3.** Immature platelet fraction and ADP-induced platelet aggregation in ticagrelor and prasugrel treated patients (adapted from: [34]).

the second — 1 hour before the next dose. This came to 26 measurements (14 at the first time point and 16 at the second) in the prasugrel group and 22 measurements (12 at the first time point and 12 at the second) in the ticagrelor group. The study proved that P-selectin expression is significantly higher in IPF compared to those without IPF in both prasugrel and ticagrelor treated patients ( $p < 0.0001$ ). This suggests that immature platelets have a larger prothrombotic potential. Moreover, P-selectin expression in immature platelets was significantly higher in patients treated with prasugrel compared with those treated with ticagrelor ( $p = 0.047$ ) [34].

Another study aimed to evaluate high on-treatment platelet reactivity (HPR). 101 male patients with the ACS were enrolled, and these patients had measured platelet function in the acute phase (T0), at 6 months (T1) and 12 months (T2) after the ACS. The study group identified three subgroups of patients: persistent (HPR at T0, T1, and T2), acute non persistent (HPR only at T0), and late (HPR only at T1 and T2). Patients with persistent HPR were more frequently with higher values of body mass index, carried CYP2C19\*2 variant, and were diabetics. Significantly higher levels of IPF at T1 as well as T2 were present in patients with late HPR. Furthermore, IPF was the only variable that correlated with late HPR ( $p = 0.016$ ). The study group concluded that late HPR presented by an elevated level of IPF is most likely correlated with inflammation [35].

The research performed so far also demonstrated that IPF has a greater prothrombotic poten-

tial than mature platelets [23]. Their importance in adverse ischemic events after cessation of dual antiplatelet therapy (DAPT) is still under investigation. Recently, a study conducted on a group of 62 patients with CAD after myocardial infarction showed that cessation of the P2Y<sub>12</sub> inhibitor treatment is associated with increased IPF in patients [36]. This occurred in either, patients receiving clopidogrel, ticagrelor or prasugrel and may partly explain the increased incidence of ischemic events after the exclusion of P2Y<sub>12</sub> inhibitor from DAPT [37–39].

### IPF in therapy

A study from 2016 evaluated whether IPF can predict antiplatelet response to thienopyridines. 300 patients undergoing elective coronary stenting who received prasugrel or clopidogrel were enrolled. IPF correlated positively with ADP-induced platelet reactivity ( $p < 0.01$ ) [40].

A study from 2011 performed by Ibrahim et al. [41] assessed the modulation of antiplatelet effects after administration of 75 mg clopidogrel for a week. 29 healthy subjects were enrolled and had their blood tested for IPF 1 week prior to daily dosing of the drug and 1 week after daily dosing of the drug. The study population was divided based on IPF concentrations into tertiles. Baseline platelet aggregation responses to 2, 5, and 20  $\mu\text{M}$  ADP were indistinguishable in all three tertiles. After 1 week of treatment with clopidogrel platelet aggregation was higher in the upper tertile than in the lower tertile in response to 5  $\mu\text{M}$  ADP ( $p = 0.02$ ). This proves that IPF can be associated with an impaired response to the antiplatelet effect of clopidogrel [41].

A study from 2010 sought to determine whether a higher level of IPF was correlated with stent thrombosis in patients who underwent percutaneous cardiac intervention and were treated with a 75 mg dose of ASA once a day. 117 patients were enrolled, 39 patients had suffered from stent thrombosis and the remaining 78 patients served as a control group. The study showed that a trend was observed towards an elevated IPF in patients who suffered from stent thrombosis but it missed statistical significance ( $p = 0.13$ ) [42].

In order to implement IPF in routine clinical care, it should be measured with whole blood count parameters on admission to hospital and during hospitalization. Afterwards, the IPF concentration should be assessed, and the optimal pharmacological treatment ought to be chosen. Among patients with chronic coronary syndromes with high IPF



concentration, a more potent P2Y<sub>12</sub> inhibitor post PCI could be considered in preference to clopidogrel, though such an approach still needs to be confirmed in randomized clinical trials.

### IPF post cardiac surgery

A study from 2017 evaluated whether IPF can be used as a biomarker for predicting MACE or other thromboembolic events after intermediate and high-risk non-cardiac surgery. The endpoint was defined as MACE, deep vein thrombosis, or pulmonary embolism during hospital stay (modMACE). A total of 732 patients were enrolled and IPF was measured preoperatively and postoperatively in the post anesthesia care unit. Preoperatively there were no differences in IPF between patients with and without modMACE. However, postoperatively patients with modMACE presented elevated levels of IPF compared with those who did not suffer from modMACE ( $p = 0.011$ ). The study group suggested an optimal cut off value of IPF > 5.4%. This proves IPF can be used for risk stratification of surgical patients [43].

### Conclusions

Immature platelet fraction is a novel and promising biomarker that may be derived using flow cytometry analysis in a relatively straightforward manner. There is evidence indicating the association between IPF concentrations and various cardiovascular diseases have potential utility as a prognostic tool among patients presenting with ACS. Furthermore, initial reports hint at the potential role of IPF in antiplatelet therapy monitoring. Further studies addressing the diagnostic, prognostic and potentially therapeutic roles of IPF are warranted.

**Conflict of interest:** None declared

### References

1. Thon JN, Italiano JE. Does size matter in platelet production? *Blood*. 2012; 120(8): 1552–1561, doi: [10.1182/blood-2012-04-408724](https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-408724), indexed in Pubmed: 22665937.
2. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005; 122(3): 379–391, doi: [10.1016/j.cell.2005.06.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.015), indexed in Pubmed: 16096058.
3. McBane RD, Gonzalez C, Hodge DO, et al. Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. *J Thromb Thrombolysis*. 2014; 37(2): 148–154, doi: [10.1007/s11239-013-0932-x](https://doi.org/10.1007/s11239-013-0932-x), indexed in Pubmed: 23645473.
4. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*. 2006; 354(19): 2034–2045, doi: [10.1056/NEJMr052706](https://doi.org/10.1056/NEJMr052706), indexed in Pubmed: 16687716.
5. Italiano JE, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(6): 1174–1182, doi: [10.1046/j.1538-7836.2003.00290.x](https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00290.x), indexed in Pubmed: 12871316.
6. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, et al. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol*. 1992; 98(6): 637–646, doi: [10.1093/ajcp/98.6.637](https://doi.org/10.1093/ajcp/98.6.637), indexed in Pubmed: 1281383.
7. Thompson CB, Eaton KA, Princiotto SM, et al. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol*. 1982; 50(3): 509–519, doi: [10.1111/j.1365-2141.1982.tb01947.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1982.tb01947.x), indexed in Pubmed: 7066203.
8. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon G, et al. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res*. 1983; 32(5): 443–460, doi: [10.1016/0049-3848\(83\)90255-4](https://doi.org/10.1016/0049-3848(83)90255-4), indexed in Pubmed: 6658722.
9. Brown AS, Martin JF. The megakaryocyte platelet system and vascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1994; 24 (Suppl 1): 9–15, doi: [10.1111/j.1365-2362.1994.tb02419.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb02419.x), indexed in Pubmed: 8013533.
10. Deutsch VR, Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol*. 2013; 161(6): 778–793, doi: [10.1111/bjh.12328](https://doi.org/10.1111/bjh.12328), indexed in Pubmed: 23594368.
11. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, et al. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2012; 9(11): 658–670, doi: [10.1038/nrcardio.2012.131](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.131), indexed in Pubmed: 22987055.
12. Joergensen MK, Bathum L. Reference intervals for mean platelet volume and immature platelet fraction determined on a sysmex XE5000 hematology analyzer. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016; 76(2): 172–176, doi: [10.3109/00365513.2015.1124448](https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1124448), indexed in Pubmed: 26853453.
13. Verdoia M, Nardin M, Rolla R, et al. Immature platelet fraction and the extent of coronary artery disease: A single centre study. *Atherosclerosis*. 2017; 260: 110–115, doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.044](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.044), indexed in Pubmed: 28388444.
14. Buttarello M, Mezzapelle G, Freguglia F, et al. Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *Int J Lab Hematol*. 2020; 42(4): 363–370, doi: [10.1111/ijlh.13177](https://doi.org/10.1111/ijlh.13177), indexed in Pubmed: 32157813.
15. Jung H, Jeon HK, Kim HJ, et al. Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med*. 2010; 30(5): 451–459, doi: [10.3343/kjlm.2010.30.5.451](https://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.5.451), indexed in Pubmed: 20890075.
16. Cannavo I, Ferrero-Vacher C, Sudaka I, et al. [Assessment of an immature platelet fraction (IFP%) in the diagnosis of thrombocytopenia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010; 68(4): 415–420, doi: [10.1684/abc.2010.0449](https://doi.org/10.1684/abc.2010.0449), indexed in Pubmed: 20650736.
17. Moraes D, Munhoz TP, Pinheiro da Costa BE, et al. Immature platelet fraction in hypertensive pregnancy. *Platelets*. 2016; 27(4): 333–337, doi: [10.3109/09537104.2015.1101060](https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1101060), indexed in Pubmed: 26587995.
18. Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2009; 101(1): 151–156, indexed in Pubmed: 19132202.

19. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost.* 2013; 109(5): 846–853, doi: [10.1160/TH12-09-0709](https://doi.org/10.1160/TH12-09-0709), indexed in Pubmed: 23494003.
20. Ritchie JL, Harker LA. Platelet and fibrinogen survival in coronary atherosclerosis. Response to medical and surgical therapy. *Am J Cardiol.* 1977; 39(4): 595–598, doi: [10.1016/s0002-9149\(77\)80171-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(77)80171-9), indexed in Pubmed: 848446.
21. Freynhofer MK, Bruno V, Brozovic I, et al. Is increased platelet turnover responsible for low responsiveness to different thienopyridines? A case report of recurrent stent thromboses. *Thromb Haemost.* 2011; 106(1): 182–184, doi: [10.1160/TH11-01-0051](https://doi.org/10.1160/TH11-01-0051), indexed in Pubmed: 21544319.
22. Grove EL, Hvas AM, Mortensen SB, et al. Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(1): 185–191, doi: [10.1111/j.1538-7836.2010.04115.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04115.x), indexed in Pubmed: 20955349.
23. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(9): 743–749, doi: [10.1016/j.jacc.2008.05.031](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.031), indexed in Pubmed: 18718422.
24. Larsen SB, Grove EL, Hvas AM, et al. Platelet turnover in stable coronary artery disease — influence of thrombopoietin and low-grade inflammation. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85566, doi: [10.1371/journal.pone.0085566](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085566), indexed in Pubmed: 24465602.
25. Pedersen OB, Hvas AM, Grove EL, et al. Association of whole blood microRNA expression with platelet function and turnover in patients with coronary artery disease. *Thromb Res.* 2022; 211: 98–105, doi: [10.1016/j.thromres.2022.01.026](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.01.026), indexed in Pubmed: 35149399.
26. Jiang P, Song Y, Xu JJ, et al. Two-year prognostic value of mean platelet volume in patients with diabetes and stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Cardiol J.* 2019; 26(2): 138–146, doi: [10.5603/CJ.a2018.0071](https://doi.org/10.5603/CJ.a2018.0071), indexed in Pubmed: 30009376.
27. Huczek Z, Filipiak KJ, Kochman J, et al. Baseline platelet size is increased in patients with acute coronary syndromes developing early stent thrombosis and predicts future residual platelet reactivity. A case-control study. *Thromb Res.* 2010; 125(5): 406–412, doi: [10.1016/j.thromres.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.09.003), indexed in Pubmed: 19786298.
28. Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, et al. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64(20): 2122–2129, doi: [10.1016/j.jacc.2014.06.1210](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1210), indexed in Pubmed: 25457402.
29. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 2008; 99(5): 930–935, doi: [10.1160/TH08-01-0002](https://doi.org/10.1160/TH08-01-0002), indexed in Pubmed: 18449424.
30. Funck-Jensen KL, Dalsgaard J, Grove EL, et al. Increased platelet aggregation and turnover in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction. *Platelets.* 2013; 24(7): 528–537, doi: [10.3109/09537104.2012.738838](https://doi.org/10.3109/09537104.2012.738838), indexed in Pubmed: 23216571.
31. Yahud E, Schilo T, Nevzorov R, et al. Immature platelet fraction over time and clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Int J Lab Hematol.* 2021; 43(5): 966–972, doi: [10.1111/ijlh.13499](https://doi.org/10.1111/ijlh.13499), indexed in Pubmed: 33715283.
32. Hallén J. Troponin for the estimation of infarct size: what have we learned? *Cardiology.* 2012; 121(3): 204–212, doi: [10.1159/000337113](https://doi.org/10.1159/000337113), indexed in Pubmed: 22516844.
33. Chia S, Senatore F, Raffel OC, et al. Utility of cardiac biomarkers in predicting infarct size, left ventricular function, and clinical outcome after primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 2008; 1(4): 415–423, doi: [10.1016/j.jcin.2008.04.010](https://doi.org/10.1016/j.jcin.2008.04.010), indexed in Pubmed: 19463339.
34. Bernlochner I, Goedel A, Plichke C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J.* 2015; 36(45): 3202–3210, doi: [10.1093/eurheartj/ehv326](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv326), indexed in Pubmed: 26216931.
35. Fabbri A, Marcucci R, Gori AM, et al. A time course study of high on treatment platelet reactivity in acute coronary syndrome male patients on dual antiplatelet therapy. *Thromb Res.* 2015; 136(3): 613–619, doi: [10.1016/j.thromres.2015.06.040](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.06.040), indexed in Pubmed: 26190692.
36. Jäger B, Vargas KG, Haller PM, et al. Immature cell fractions after cessation of chronic P2Y<sub>12</sub>-inhibition in patients with coronary artery diseases. *Platelets.* 2021; 32(6): 815–820, doi: [10.1080/09537104.2020.1803252](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1803252), indexed in Pubmed: 32762577.
37. Mavrakas TA, Chatzizisis YS, Gariani K, et al. Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents. *N Engl J Med.* 2014; 371(23): 2155–2166, doi: [10.1056/NEJMoa1409312](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409312), indexed in Pubmed: 25399658.
38. Bonaca MP, Bhatt DL, Steg PG, et al. Ischaemic risk and efficacy of ticagrelor in relation to time from P2Y<sub>12</sub> inhibitor withdrawal in patients with prior myocardial infarction: insights from PEGASUS-TIMI 54. *Eur Heart J.* 2016; 37(14): 1133–1142, doi: [10.1093/eurheartj/ehv531](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv531), indexed in Pubmed: 26491109.
39. van Werkum JW, Heestermaas AA, Zomer AC, et al. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53(16): 1399–1409, doi: [10.1016/j.jacc.2008.12.055](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.055), indexed in Pubmed: 19371823.
40. Stratz C, Bömicke T, Younas I, et al. Comparison of immature platelet count to Established predictors of platelet reactivity during thienopyridine therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 68(3): 286–293, doi: [10.1016/j.jacc.2016.04.056](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.056), indexed in Pubmed: 27417007.
41. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, et al. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis.* 2012; 33(2): 137–142, doi: [10.1007/s11239-011-0665-7](https://doi.org/10.1007/s11239-011-0665-7), indexed in Pubmed: 22198802.
42. Würtz M, Grove EL, Wulff LN, et al. Patients with previous definite stent thrombosis have a reduced antiplatelet effect of aspirin and a larger fraction of immature platelets. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010; 3(8): 828–835, doi: [10.1016/j.jcin.2010.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jcin.2010.05.014), indexed in Pubmed: 20723855.
43. Anetsberger A, Blobner M, Haller B, et al. Immature platelets as a novel biomarker for adverse cardiovascular events in patients after non-cardiac surgery. *Thromb Haemost.* 2017; 117(10): 1887–1895, doi: [10.1160/TH16-10-0804](https://doi.org/10.1160/TH16-10-0804), indexed in Pubmed: 28796275.

## 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

### 7.1 Podsumowanie wyników

W przeprowadzonym prospektywnym badaniu zrekrutowano 140 pacjentów z ACS poddawanych DAPT z wykorzystaniem tikagreloru lub kłopidogrelu zgodnie z kryteriami włączenia i wykluczenia przedstawionymi poniżej (Tabela 1.).

**Tabela 1. Kryteria włączenia i wyłączenia**

Kryteria włączenia	Kryteria wyłączenia
<ul style="list-style-type: none"><li>• Wiek <math>\geq 18</math> lat w momencie rekrutacji.</li><li>• Hospitalizacja z powodu ACS.</li><li>• Zdolność do wyrażenia pisemnej świadomej zgody w przedziale czasowym 1-24 godzin po udanej PCI.</li><li>• Pacjenci z ACS poddawani PCI z użyciem DES nowej generacji.</li><li>• Zastosowanie dawki nasycającej antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub> po rozpoznaniu ACS lub podczas PCI.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Niestabilny stan kliniczny (niestabilność hemodynamiczna lub elektryczna).</li><li>• Planowany zabieg chirurgiczny wymagający przerwania DAPT w trakcie badania.</li><li>• Rewaskularyzacja wieńcowa (chirurgiczna lub przezskórna) planowana w ciągu 90 dni od rekrutacji.</li><li>• Wywiad udaru, przemijającego ataku niedokrwienego lub krwawienia wewnątrzczaszkowego.</li><li>• Ciężkie zaburzenia czynności wątroby (wyjściowa wartość ALT <math>\geq 2,5</math>-krotność górnej granicy normy).</li><li>• Niewydolność nerek z eGFR <math>\leq 30</math> ml/min obliczonego za pomocą wzoru Cockrofta-Gaulta lub wymagająca hemodializy.</li><li>• Ciężka niedokrwistość (Hgb <math>&lt; 8</math>g/dl).</li><li>• PLT <math>&lt; 70 \times 10^3</math>/ml.</li><li>• HCT poniżej 30% lub powyżej 52%.</li><li>• Aktywne krwawienie.</li><li>• Udokumentowana nadwrażliwość lub przeciwwskazania do stosowania ASA, kłopidogrelu, tikagreloru lub prasugrelu.</li><li>• Cięża.</li><li>• Niezdolność do zrozumienia i przestrzegania instrukcji postępowania związanych z badaniem.</li><li>• Udział w innym badaniu.</li></ul>

Rozwinięcie skrótów: ACS (acute coronary syndrome) – ostry zespół wieńcowy; ALT (alanine transaminase) – aminotransferaza alaninowa; ASA (acetylsalicylic acid) – kwas acetylosalicylowy; DAPT (dual antiplatelet therapy) – podwójna terapia przeciwplatetkowa; DES (drug eluting stent) – stent uwalniający lek; eGFR (estimated glomerular filtration rate) – szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej; HCT (haematocrit) – hematokryt; Hgb (haemoglobin) – stężenie hemoglobiny; PCI (percutaneous coronary intervention) – przezskórna interwencja wieńcowa; PLT (platelet count) – wskaźnik liczby płytek krwi.

Spośród nich pełną oceną klinicznych punktów końcowych przeprowadzono u 130 pacjentów, jak opisano w Publikacji 3. Dodatkowo, pomiary agregacji płytek krwi indukowanej ADP przy użyciu analizatora Multiplate® przeprowadzono u 108 pacjentów, w tym 62 z ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem odcinka ST (*ST elevation acute coronary syndrome*, STE-ACS) i 46 z ostrym zespołem wieńcowym bez uniesienia odcinka ST (*non-ST elevation acute coronary syndrome* NSTEMI-ACS), jak opisano w Publikacji 1. Zbadalam również poziomy ekspresji miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p i miR-24-3p u 97 pacjentów, w tym dodatkowo zrekrutowanych 18 leczonych prasugrelem i 18 zdrowych ochotników, co szczegółowo przedstawiłam w Publikacji 2. Prezentowane analizy dostarczają ważnych informacji na temat ocenianych biomarkerów w kontekście skuteczności terapii przeciwplatekowej. Wyniki badań przedstawionych w niniejszym cyklu publikacji można podsumować w następujący sposób:

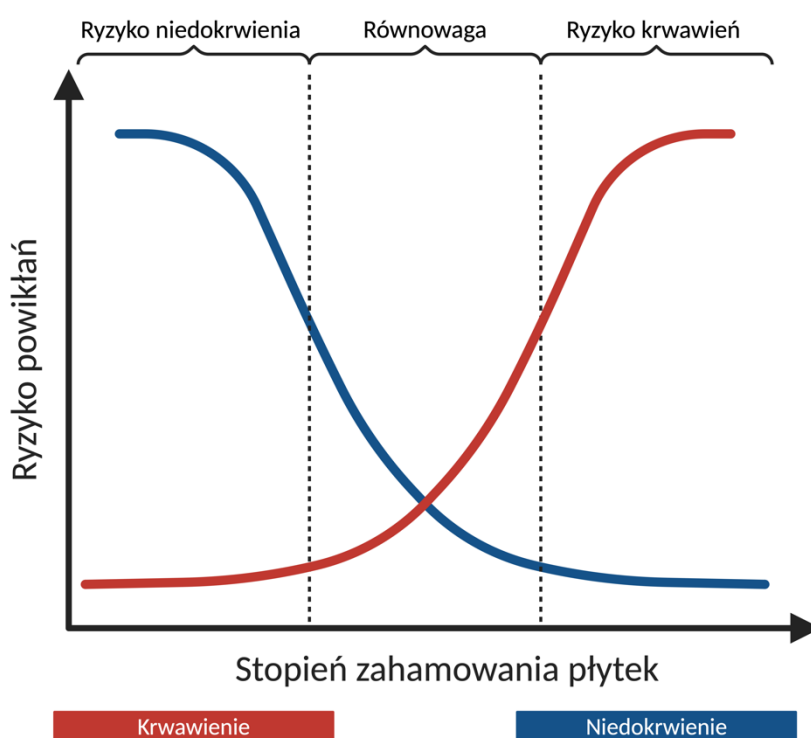
- Istnieje pozytywna korelacja między IPF oraz IPC, a wynikami pomiarów agregacji płytek krwi indukowanej ADP (odpowiednio:  $\rho = 0,387$  95% CI: 0,101–0,615,  $p = 0,008$ ;  $\rho = 0,458$  95% CI: 0,185–0,666,  $p = 0,001$ ) u pacjentów z NSTEMI-ACS (Publikacja 1). Zależności takiej nie zaobserwowałam jednak w grupie osób hospitalizowanych z powodu STEMI.
- Istnieje również pozytywna korelacja między wynikami pomiarów agregacji płytek krwi indukowanej ADP, a poziomem ekspresji miR-223-3p oraz miR-21-3p (odpowiednio:  $\rho = 0,400$ ,  $p = 0,019$ ;  $\rho = 0,423$ ,  $p = 0,013$ ) obecna jedynie w kohorcie leczonej silnymi lekami przeciwplatekowymi (Publikacja 2).
- Wszystkie zbadane miRs wykazały znaczące zmniejszenie ekspresji przy zastosowaniu silniejszego antagonisty receptora P2Y<sub>12</sub> tj. tikagreloru w porównaniu z kłopidogrelem. Dla miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p uzyskano wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ), podczas gdy dla miR-24-3p obserwowano jedynie trend w tym kierunku ( $p = 0,067$ ).
- Odsetek IPF u pacjentów z ACS ma wartość predykcyjną w przewidywaniu niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych zarówno w krótkoterminowej (Publikacja 4), jak również w długoterminowej obserwacji (Publikacja 3). Głównym punktem końcowym wpływającym na zależność w 5-letniej obserwacji w prezentowanej pracy były zgony sercowo-naczyniowe.
- W długoterminowej (5-letniej) obserwacji (Publikacja 3) MACE wystąpiły u 21% pacjentów, a najczęstszym z nich był zgon sercowo-naczyniowy.



- Ryzyko MACE było najniższe u pacjentów, ze stężeniem IPF poniżej 2,2% (najniższy tercyl). W porównaniu z pacjentami ze stężeniem IPF w najwyższym tercylu (to jest co najmniej 3,7%) różnica ta była istotna statystycznie ( $p=0,008$ ), natomiast w porównaniu z grupą z wartościami IPF w drugim tercylu obserwowano tendencję w tym kierunku ( $p = 0,067$ ). Ponadto, wykazałam, że IPF był niezależnym predyktorem MACE (HR 1,279 95% CI: 1,056-1,549,  $p = 0,012$ ).
- Jako optymalny punkt odcięcia dla IPF w przewidywaniu MACE w 5-letniej obserwacji analiza krzywej ROC wykazała stężenie 3,45%. (czułość 63%, swoistość 65%). Wynik był porównywalny z wartościami raportowanymi wcześniej przez innych badaczy w badaniach z krótszym okresem obserwacji.
- Przegląd piśmiennictwa (Publikacja 4) i zawarte w nim dane sugerują, że pomiar IPF może być wartościowym testem w diagnostyce sercowo-naczyniowej i monitorowaniu terapii przeciwplatekowej. Jego wykonanie jest stosunkowo proste technicznie, bezpieczne dla pacjenta i mało kosztowne. Uzasadnione są dalsze badania dotyczące diagnostycznej i prognostycznej roli IPF.

## 7.2 Implikacje kliniczne i wyznaczenie dalszych kierunków badań

Obecnie schemat długoterminowego postępowania wśród pacjentów z ACS podkreśla konieczność indywidualizacji farmakoterapii przeciwplatekowej. Pierwszym krokiem przed podjęciem decyzji dotyczącej proponowanej strategii DAPT powinna być ocena ryzyka powikłań krwotocznych i niedokrwiennych. Celem indywidualizacji terapii jest uzyskanie optymalnego stopnia zahamowania płytek krwi, zachowując równowagę pomiędzy ryzykiem tych zdarzeń (Rycina 1.).



**Rycina 1. Schemat ilustrujący zależność pomiędzy ryzykiem powikłań zakrzepowozatorowych i krwotocznych a stopniem zahamowania płytek krwi**

Standardowo, przy niskim ryzyku zdarzeń krwotocznych i niedokrwiennych preferuje się 12-miesięczną DAPT ASA i prasugrelem, bądź tikagrelorem. Nierzadko zachodzi jednak konieczność wyboru lub zmiany leku na klopidoogrel ze względu na zagrożenie powikłaniami krwotocznymi, innymi działaniami niepożądanymi silniejszych leków lub czynnikami socjoekonomicznymi, na co również zwrócono uwagę w wytycznych ESC z 2023 roku [10].

Zgodnie z rekomendowanymi w wytycznych klinicznych skalami ryzyka tj. skala PRESICE DAPT [52] czy ARC-HBR (*Academic Research Consortium for High Bleeding Risk*) [53], oczywistą jest konieczność wykonania badań laboratoryjnych, w tym morfologii. Na podstawie przedstawionych powyżej obserwacji, wydaje się, że korzystne może być rozszerzenie badania o dodatkowe parametry płytkowe: IPF oraz IPC, które można ocenić pobierając kilka mililitrów krwi z żyły obwodowej, a sam test laboratoryjny wykonuje się przy pomocy powszechnie dostępnych analizatorów hematologicznych w ramach rozszerzonego badania morfologicznego. Wiąże się to z minimalnym dodatkowym kosztem, podobnym czasem oczekiwania na wynik i brakiem konieczności wykonywania dodatkowych procedur przez lekarzy czy personel pielęgniarski. Wysoka wartość IPF mogłaby być czynnikiem wskazującym na ewentualną konieczność dokładniejszego monitorowania terapii i w razie potrzeby wykonania dodatkowych PFT. Ze względu na niejednoznaczne wartości punktów odcięcia na ten moment klinicyści podejmujący decyzje o włączaniu tego parametru do modelu stratyfikacji ryzyka powinni opierać się na dotychczasowych badaniach, w których za związany z gorszym rokowaniem poziom określano co najmniej na 3,3%. Należy jednak zaznaczyć, że czułość i specyficzność IPF wydaje się jednak zbyt niska, aby mogła służyć jako samodzielne narzędzie do podejmowania decyzji terapeutycznych. IPF może stanowić dodatkowy element stratyfikacji ryzyka dołączony do skal klinicznych lub pełnić rolę testu, którego nieprawidłowy wynik będzie skłaniać lekarza prowadzącego do dokładniejszego monitorowania odpowiedzi na leczenie przeciwplatek z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych PFT. W świetle aktualnych wytycznych ESC rutynowe wykonywanie PFT nie jest rekomendowane, a można je rozważyć u osób z niekorzystnym profilem ryzyka i w zależności od dostępności odpowiednich testów z rekomendacją w klasie IIb (poziom dowodów naukowych A) [15].

Rola miR w optymalizacji i monitorowaniu terapii przeciwplatekowej wciąż wymaga lepszego zrozumienia, zanim stanie się elementem praktyki klinicznej. W mojej pracy wykazałam, że ekspresja co najmniej 4 z 5 przebadanych przeze mnie cząsteczek dobrze korelowała z siłą zahamowania aktywności płytek krwi, przyjmując średnio niższą wartość u pacjentów leczonych tikagrelorom w porównaniu z kłopidogrelom. Ponadto, ekspresja miR-223 była także niższa u pacjentów leczonych prasugrelom, mimo niewielkiej grupy badanej, a także wykazywała umiarkowaną korelację z dobrze poznanym PFT – agregometrią impedancyjną w odpowiedzi na ADP z użyciem analizatora Multiplate®. Wyniki spójnie sugerują, że silniejsza inhibicja płytek wiąże się z niższą ekspresją miR-223. Podobne obserwacje dotyczą miR-21,

z pominięciem zależności dla grupy leczonej prasugrelem. Należy jednak mieć na uwadze mały rozmiar grupy analizowanej w prezentowanej pracy. Przedstawione wyniki dają nadzieję na możliwość wykorzystania w przyszłości miR-223 i miR-21 na etapie planowania i optymalizacji terapii przeciwplatekowej, szczególnie pod kątem wczesnego weryfikowania adekwatności odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem u osób, u których silniejsze leki mogą być z różnych powodów mniej bezpieczne. Podobne wyniki obserwowałam dla miR-197 oraz dla miR-126, którego ekspresja była dodatkowo niższa przy leczeniu przeciwplatekowym w porównaniu z grupą kontrolną. W ich przypadku natomiast nie zaobserwowaliśmy korelacji z reaktywnością płytek krwi w agregometrii impedancyjnej.

Potencjalną przewagę miRs nad dotychczas stosowanymi testami stanowi ich większa stabilność i powtarzalność pomiarów. Zanim jednak ich użycie będzie możliwe w praktyce klinicznej, konieczne jest potwierdzenie uzyskanych przeze mnie wyników na dużej grupie pacjentów, a w kolejnym kroku standaryzacja testów służących do ich oznaczania. Mnogość platekowych miR i zdolność wielu z nich do wpływania na te same geny sprawia, że zrozumienie złożonej interakcji między nimi wydaje się wciąż dużym wyzwaniem. W kontekście prowadzenia terapii przeciwplatekowej, przyszłe prace powinny zbadać wykorzystanie miR z naciskiem na zastosowanie technologii mikromacierzy. Podejście to jest obiecujące ze względu na jego potencjał do kompleksowej oceny profili miR, co może poprawić nasze zrozumienie i zastosowanie terapii opartych na tych cząsteczkach [54].

### 7.3 Ograniczenia wnioskowania

Do głównych ograniczeń poniższego badania należy ograniczona liczba badanych pacjentów. Wykazano istotną statystycznie różnicę w występowaniu MACE u pacjentów z najniższymi w porównaniu z pacjentami z najwyższymi wartościami IPF (1. vs 3. tercyl). Ryzyko MACE było również wyższe u pacjentów w środkowym tercylu w porównaniu z najniższym tercylem, obserwowano różnice nie osiągnęły jednak istotności statystycznej ( $p = 0,067$ ), co może być związane z ograniczoną mocą statystyczną przy włączonej do badania populacji, niekoniecznie oznaczając faktyczny brak istotnej różnicy. Przedstawione badanie dostarcza zatem interesujących hipotez, których dalsze potwierdzenie jest konieczne w ramach kolejnych prac z uwzględnieniem większej populacji. Ograniczenie to jest także istotne w części pracy poświęconej miRs. Obserwowane różnice w ekspresji trzech spośród czterech miRs pomiędzy pacjentami leczonymi tikagrelorem a pacjentami przyjmującymi klopidoogrel wydają się być nieobecne dla populacji przyjmującej prasugrel. Niewielka próba badana leczona prasugrelem jest jednak istotnym czynnikiem ograniczającym możliwość wyciągnięcia takiego wniosku, szczególnie biorąc pod uwagę patofizjologiczne podstawy i siłę działania poszczególnych antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub>. Hipoteza ta wymaga potwierdzenia na większej populacji pacjentów.

Istotnym ograniczeniem pracy jest także jednokrotny pomiar parametrów jedynie w ostrej fazie choroby – w pierwszej dobie po przezskórnej interwencji wieńcowej (*percutaneous coronary intervention*, PCI). Na podstawie wyników niektórych prac można podejrzewać, że związek między poziomem IPF a odpowiedzią na leczenie przeciwplatekawe był obserwowany w ostrej fazie – między pierwszym a 30 dniem od ACS, natomiast w pomiarach między 30-90 dniem nie był obecny [24, 25, 26]. Niemniej jednak potwierdzenie opisanych przez nas zależności w późniejszej fazie choroby wydaje się być tematem wymagającym dokładniejszego wyjaśnienia w kolejnych badaniach. Mimo dokonywania pomiarów w jednym punkcie czasowym, zaobserwowaliśmy jednak istotną zależność pomiędzy IPF a ryzykiem MACE. Nie można wykluczyć, że dokładniejsze porównanie zmienności odsetka niedojrzałych płytek w czasie pomogłoby osiągnąć lepszą czułość i swoistość w przewidywaniu niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Ponadto, pacjenci leczeni klopidoogrelem stanowili istotny odsetek badanej populacji. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi preferowanymi w leczeniu ACS antagonistami receptora P2Y<sub>12</sub> są nowsze, silniejsze leki, takie jak prasugrel i tikagrelor. Po pierwsze należy mieć jednak

na uwadze fakt, że rekrutacja pacjentów odbywała się w latach 2017-2018, przed pojawieniem się europejskich wytycznych z 2020 roku dotyczących leczenia NSTEMI-ACE, jak również wytycznych dla ACS z 2023 roku, które wskazują, że należy rozważyć preferowanie prasugrelu względem tikagreloru w tej populacji. Stąd częściej stosowanym lekiem, głównie ze względu na dostępność, był tikagrelor. Co więcej, przedstawione badanie jest badaniem obserwacyjnym bez zaślepienia. To operator wykonujący zabieg decydował o stosowanym leku. Pomimo dowodów na wyższość innych antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub>, kłopidogrel ma wciąż swoje istotne miejsce w terapii osób starszych lub posiadających przeciwwskazania do nowszych leków. Odsetki w poszczególnych grupach terapeutycznych w naszym badaniu są spójne z ogólnopolskimi statystykami stosowania antagonistów receptora P2Y<sub>12</sub> z tego okresu w Polsce [55].

## 7.4 Wnioski

1. Zróżnicowana odpowiedź na terapię przeciwplatekowaną u poszczególnych osób wskazuje na konieczność implementacji spersonalizowanych strategii leczenia. Włączenie nowych biomarkerów do wstępnej analizy ryzyka w tej grupie może potencjalnie stanowić cenny element bardziej spersonalizowanego postępowania.
2. Wartość IPF u pacjentów z NSTEMI-ACS przyjmujących DAPT koreluje z wynikiem agregometrii impedancyjnej indukowanej ADP.
3. Ekspresja miR-126-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-197-3p istotnie różni się między pacjentami otrzymującymi silne (tikagrelor) oraz słabsze (klopidogrel) leki z grupy antagonistów receptora P2Y12 w ramach DAPT, a ponadto ekspresja miR-223-3p i miR-21-5p koreluje z wynikiem agregometrii impedancyjnej.
4. IPF u pacjentów z ACS ma wartość predykcyjną w przewidywaniu MACE w obserwacji długoterminowej. Jednocześnie czułość i swoistość IPF wydaje się na ten moment zbyt niska, aby mogła służyć jako samodzielne narzędzie do podejmowania decyzji terapeutycznych.
5. Uzasadnione są dalsze badania nad wykorzystaniem IPF oraz wybranych płytkowych miR w ocenie rokowania oraz odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe w ACS.



## **8. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ**



**Komisja Bioetyczna  
przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym**

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/.....<sup>242</sup>...../2015

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
po zapoznaniu się z wnioskiem /wymienić wnioskodawcę/ - w dniu 01 grudnia 2015r.  
**Lek. Mariusz Tomaniak, I Katedra i Klinika Kardiologii,  
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa,**

**dotyczącym:** wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: : „Optymalizacja terapii przeciwplytkowej w przeszłonych interwencjach wieńcowych-nowe metody diagnostyczne.”

**wyraża następującą  
opinię**

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*

**Uwagi Komisji-verte**

**Pouczenie-**w ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje Prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZIOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007 r.w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.  
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP.

W załączeniu- skład Komisji oraz lista obecności.

**Zastępca Przewodniczącej  
Komisji Bioetycznej**

  
**Prof. dr hab.Barbara Gajkowska**

\*niepotrzebne skreślić

**9. OŚWIADCZENIA WSZYSTKICH WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI  
OKREŚLAJĄCE INDYWIDUALNY WKŁAD KAŻDEGO Z NICH W POWSTANIE  
PRACY**

Warszawa, 19.01.2024 r.

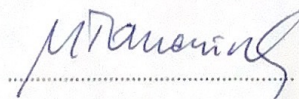
Dr hab. n. med. Mariusz Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji pracy, rekrutacja pacjentów, analiza i interpretacja danych, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

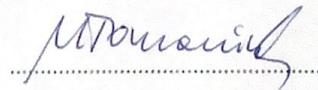
Dr hab. n. med. Mariusz Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja pracy i projekt badania, analiza i interpretacja danych, krytyczna rewizja artykułu, akceptacja ostatecznej wersji pracy**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **10%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

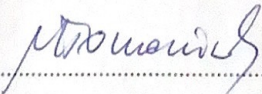
Dr hab. n. med. Mariusz Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w tworzeniu koncepcji pracy i identyfikacja luk w wiedzy, przegląd literatury, krytyczna ocena i korekta oraz końcowa akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 29.01.2024r.

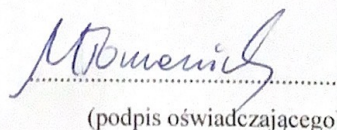
Dr hab. n. med, Mariusz Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w tworzeniu koncepcji pracy i projekt badania, analiza i interpretacja danych, pisanie, krytyczna ocena i korekta artykułu, akceptacja ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **5%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizacja, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Marcin Grabowski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Opolski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja pracy, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja pracy**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określiam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

3718999 Prof. dr hab. med. Grzegorz Opolski  
specjalista chorób wewnętrznych  
k a r o l i n a g

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Opolski

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **Ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu.** Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

3710990 | Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Opolski  
specjalista chorób wewnętrznych  
kardiolog

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kochman

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kochman

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

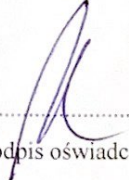
Prof. dr hab. n. med. Janusz Kochman

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizacja, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

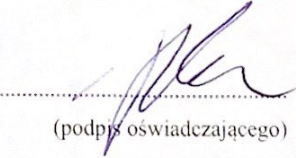
Prof. dr hab. n. med. Janusz Kochman

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

WARSZAWSKI  
UNIwersYTET MEDYCZNY  
Wydział Farmaceutyczny  
*prof. dr hab. Grażyna Sygitowicz*

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

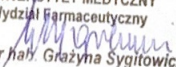
Prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja i udział w opracowaniu metodologii, ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

WARSZAWSKI  
UNIwersYTET MEDYCZNY  
Wydział Farmaceutyczny  
  
prof. dr hab. Grażyna Sygitowicz

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja, zbieranie i analiza danych w tym wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, krytyczna ocena i korekta tekstu, ostateczna akceptacja artykułu.** Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **5%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

WARSZAWSKI  
UNIwersYTET MEDYCZNY  
Wydział Farmaceutyczny  
*G. Sygitowicz*  
prof. dr hab. Grażyna Sygitowicz

.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023 r.


Prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

WARSZAWSKI  
UNIwersYTET MEDYCZNY  
Wydział Farmaceutyczny  
  
.....  
prof. dr hab. Grażyna Sygitowicz

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 12.01.2024 r.

Dr n. med. Dorota Ochijewicz

### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przegląd literatury i podsumowanie artykułów, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

*Dorota Ochijewicz*

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.01.2024 r.

Dr n. med. Dominika Klimczak-Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

*D. Klimczak-Tomaniak*

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.01.2024r.

Dr n. med. Dominika Klimeczak Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w tworzeniu koncepcji pracy, identyfikacja dotychczasowych luk badawczych, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

*D. Klimeczak-Tomaniak*.....

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Dr n. med. Dominika Klimczak-Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **konceptualizacja pracy i projekt badania, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

D. Klimczak-Tomaniak

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.01.2024r.

Dr n. med. Dominika Klimczak-Tomaniak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **ocena merytoryczna projektu, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

D. Klimczak-Tomaniak

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 10.01.2024r.

Lek. Piotr Baruś

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie i opracowywanie danych, pisanie artykułu, ostateczna akceptacja pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

PIOTR BARUŚ  
LEK. KR.  
8635945

.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Lek. Piotr Baruś

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie danych pacjentów, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

PIOTR BARUŚ  
LEKARZ

.....3835945.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023 r.

Lek. Piotr Baruś

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie, interpretacja i przedstawienie danych, przygotowywanie tekstu artykułu, ostateczna akceptacja manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

PIOTR BARUŚ  
LEKARZ  
3035945

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Lek. Piotr Baruś

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, przegląd literatury i usystematyzowane podsumowanie dotychczasowych badań, pisanie artykułu, akceptację ostatecznej wersji pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

PIOTR BARUŚ  
LEKARZ  
3635945

.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

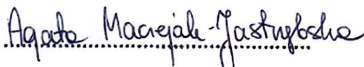
Dr n. <sup>biol.</sup> ~~med.~~ Agata Maciejak-Jastrzębska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNA as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: udział w wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych, analiza i interpretacja danych, krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %. obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
(podpis oświadczającego)

---

Warszawa, 19.12.2023r.

Mgr Agnieszka Wiśniewska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **przegląd literatury i synteza dotychczasowej wiedzy, krytyczna ocena i korekta oraz końcowa akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **1%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.


Mgr Agnieszka Wiśniewska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **wykonywanie oznaczeń laboratoryjnych i analiza otrzymanych wyników, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Mgr Agnieszka Wiśniewska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **zbieranie i analiza danych w tym wykonywanie oznaczeń laboratoryjnych, ostateczna akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

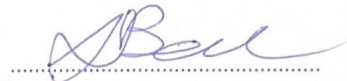
Adrian Bednarek

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza statystyczna, interpretacja i przedstawienie danych, przygotowywanie tekstu artykułu, ostateczna akceptacja manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Adrian Bednarek

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction and immature platelet count as novel biomarkers of elevated platelet reactivity in NSTEMI-ACS patients receiving dual antiplatelet therapy* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie i opracowywanie danych, analiza statystyczna, pisanie artykułu, ostateczna akceptacja pracy. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 65 %, obejmował on: konceptualizację pracy i projekt badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023 r.


Adrian Bednarek

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza statystyczna, zbieranie, interpretacja i przedstawienie danych, przygotowywanie tekstu artykułu i rycin, ostateczna akceptacja manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023r.

Adam Piasecki

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie danych klinicznych, akceptacja ostatecznej wersji artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

Karolina Pasierb

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: pisanie artykułu, tworzenie elementów graficznych, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.



.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.12.2023r.

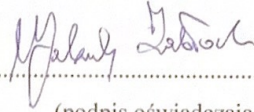
Jakub Zablocki

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Prognostic implications of immature platelet fraction at 5-year follow-up among ACS patients treated with dual antiplatelet therapy*. oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie danych klinicznych pacjentów, wizualizacja danych, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.12.2023 r.

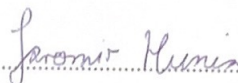
Jaromir Hunia

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Platelet microRNAs as potential novel biomarkers for antiplatelet therapy with P2Y12 inhibitors and their association with platelet function* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza statystyczna, przedstawienie danych, przygotowywanie rycin, ostateczna akceptacja manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 60 %, obejmował on: konceptualizację pracy i zaprojektowanie badania, rekrutację pacjentów, zbieranie i opracowywanie danych, analizę statystyczną i interpretację danych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 21.01.2024r.

Dr hab. n. med. Ewa Kuca-Warnawin

### OŚWIADCZENIE

Jako współautorka pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: krytyczna analiza i korekta artykułu, ostateczna akceptacja artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: konceptualizację i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

Z-CIA KIEROWNIKA  
KATEDRY PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII  
Instytut Patologii i Immunologii  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego  
*Ewa Kuca-Warnawin*  
(podpis oświadczającego)  
Dr hab. n. med. Ewa Kuca-Warnawin



Warszawa, 12.01.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Filipiak

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Immature platelet fraction in cardiovascular diagnostics and antiplatelet therapy monitoring* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: **udział w tworzeniu koncepcji pracy, krytyczna ocena i korekta oraz końcowa akceptacja artykułu**. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako **2%**.

Wkład Karoliny Gumiężnej w powstawanie publikacji określam jako 40 %, obejmował on: udział w tworzeniu koncepcji i identyfikację luk w wiedzy, organizację pracy, przegląd literatury, tworzenie elementów graficznych, pisanie artykułu, ostateczną akceptację artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Karoliny Gumiężnej.

Prof. dr hab. n. med.  
**KRZYSZTOF J. FILIPIAK**  
specjalista chorób wewnętrznych  
specjalista hipertensjolog  
farmakolog kliniczny  
.....  
**KARDJOLOG**  
6144796

(podpis oświadczającego)

## **10. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA**

Realizacja przedstawionego badania była możliwa dzięki środkom finansowym z grantu naukowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (Minigrant Studencki nr M/MG/71/22).

Przeprowadzenie skutecznych oznaczeń było możliwe dzięki dostępowi do specjalistycznego sprzętu udostępnionego przez I Katedrę i Klinikę Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

## 11. PODZIĘKOWANIA

### **Serdeczne podziękowania kieruję do:**

Mojego promotora i opiekuna naukowego, doktora habilitowanego nauk medycznych Mariusza Tomaniaka – za niezwykle wsparcie, mądrość i cenne wskazówki, które były fundamentem tej pracy. Dziękuję za cierpliwość, inspiracje i niezwykle zaangażowanie w moją naukową podróż, a także za mentorstwo, które stanowiło dla mnie nie tylko naukowy drogowskaz, lecz również inspirację do przekraczania własnych granic.

Profesora Grzegorza Opolskiego oraz Profesora Marcina Grabowskiego, kierowników I Katedry i Kliniki Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a także Profesora Janusza Kochmana, kierownika Pracowni Kardiologii Inwazyjnej – za udostępnienie niezbędnych zasobów oraz za wiarę w moje badania. Otwarte drzwi Kliniki umożliwiły mi rozwijanie projektów naukowych w najbardziej stymulującym środowisku.

Współautorom artykułów naukowych, których imiona znalazły się obok mojego podczas publikacji – pragnę wyrazić głęboką wdzięczność za wspólną pracę oraz za nieocenioną pomoc, bez której powstanie powyższej pracy nie byłoby możliwe.

Mojej rodzinie i przyjaciołom, którzy wspierali mnie w całym procesie powstawania pracy – za nieustające zrozumienie i motywację, która była moim największym źródłem siły.

## 12. PIŚMIENICTWO

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639.
2. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, Gale CP, Maggioni AP, Petersen SE, Huculeci R, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 2022;43(8):716-99.
3. Centrala Narodowego Funduszu Zdrowia DAiI. NFZ o zdrowiu. Choroba niedokrwienne serca.; 2020.
4. Piironen M, Ukkola O, Huikuri H, Havulinna AS, Koukkunen H, Mustonen J, Ketonen M, Lehto S, Airaksinen J, Antero Kesaniemi Y, et al. Trends in long-term prognosis after acute coronary syndrome. *Eur J Prev Cardiol*. 2017;24(3):274-80.
5. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*. 2007;31(10):1339-41.
6. Haft JJ. Role of blood platelets in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1979;43(6):1197-206.
7. Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, Reimann JD, Braunwald E. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(3):634-9.
8. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004-13.
9. Nardin M, Verdoia M, Cao D, Nardin S, Kedhi E, Galasso G, van 't Hof AWJ, Condorelli G, De Luca G. Platelets and the Atherosclerotic Process: An Overview of New Markers of Platelet Activation and Reactivity, and Their Implications in Primary and Secondary Prevention. *J Clin Med*. 2023;12(18).
10. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, Claeys MJ, Dan GA, Dweck MR, Galbraith M, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2023;44(38):3720-826.
11. Gao H, Yang N, Yang L, Wang H, Zhang G, Ma X, Deng N. Advances and Perspectives in methods for identifying high platelet reactivity. *Heliyon*. 2023;9(12):e22214.
12. Gurbel PA, Tantry US. Do platelet function testing and genotyping improve outcome in patients treated with antithrombotic agents?: platelet function testing and genotyping

improve outcome in patients treated with antithrombotic agents. *Circulation*. 2012;125(10):1276-87; discussion 87.

13. Oliphant CS, Trevarrow BJ, Dobesh PP. Clopidogrel Response Variability: Review of the Literature and Practical Considerations. *J Pharm Pract*. 2016;29(1):26-34.

14. Sato T, Namba Y, Kashihara Y, Tanaka M, Fuke S, Yumoto A, Saito H. Clinical significance of platelet reactivity during prasugrel therapy in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiol*. 2017;70(1):35-40.

15. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthelémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289-367.

16. Fitchett D. The impact of bleeding in patients with acute coronary syndromes: how to optimize the benefits of treatment and minimize the risk. *Can J Cardiol*. 2007;23(8):663-71.

17. Allan HE, Vadgama A, Armstrong PC, Warner TD. Platelet ageing: A review. *Thromb Res*. 2023;231:214-22.

18. Armstrong PC, Hoefer T, Knowles RB, Tucker AT, Hayman MA, Ferreira PM, Chan MV, Warner TD. Newly Formed Reticulated Platelets Undermine Pharmacokinetically Short-Lived Antiplatelet Therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):949-56.

19. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Casola G, Balzi D, Barchielli A, Valente S, Giglioli C, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):846-53.

20. Bongiovanni D, Schreiner N, Gosetti R, Mayer K, Angiolillo DJ, Sibbing D, Holdenrieder S, Anetsberger A, von Scheidt M, Schunkert H, et al. Immature Platelet Fraction Predicts Adverse Events in Patients With Acute Coronary Syndrome: the ISAR-REACT 5 Reticulated Platelet Substudy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(2):e83-e93.

21. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schupke S, Haller B, Schulz C, Mayer K, Morath T, Braun S, Schunkert H, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2015;36(45):3202-10.

22. Funck-Jensen KL, Dalsgaard J, Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Increased platelet aggregation and turnover in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction. *Platelets*. 2013;24(7):528-37.

23. Perl L, Lerman-Shivek H, Rechavia E, Vaduganathan M, Leshem-Lev D, Zemer-Wassercug N, Dadush O, Codner P, Bental T, Battler A, et al. Response to prasugrel and levels



of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(6):513-7.

24. Verdoia M, Pergolini P, Nardin M, Rolla R, Barbieri L, Schaffer A, Marino P, Bellomo G, Suryapranata H, De Luca G. Impact of diabetes on immature platelets fraction and its relationship with platelet reactivity in patients receiving dual antiplatelet therapy. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42(2):245-53.

25. Verdoia M, Pergolini P, Rolla R, Suryapranata H, Kedhi E, De Luca G, GobotNASG. Impact of immature platelet fraction on platelet reactivity during prasugrel maintenance treatment. *Platelets*. 2019;30(7):915-22.

26. Verdoia M, Sartori C, Pergolini P, Nardin M, Rolla R, Barbieri L, Schaffer A, Marino P, Bellomo G, Suryapranata H, et al. Immature platelet fraction and high-on treatment platelet reactivity with ticagrelor in patients with acute coronary syndromes. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41(4):663-70.

27. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensini GF, Abbate R, Gori AM. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008;99(5):930-5.

28. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikian M, Tellez A, DeLao T, Granada JF, Dong JF, Kleiman NS, Lev EI. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(9):743-9.

29. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, Guthikonda S, Kleiman NS. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis*. 2012;33(2):137-42.

30. Stratz C, Bomicke T, Younas I, Kittel A, Amann M, Valina CM, Nuhrenberg T, Trenk D, Neumann FJ, Hochholzer W. Comparison of Immature Platelet Count to Established Predictors of Platelet Reactivity During Thienopyridine Therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(3):286-93.

31. Stratz C, Nuhrenberg T, Amann M, Cederqvist M, Kleiner P, Valina CM, Trenk D, Neumann FJ, Hochholzer W. Impact of reticulated platelets on antiplatelet response to thienopyridines is independent of platelet turnover. *Thromb Haemost*. 2016;116(5):941-8.

32. Schmidt RA, Morrell CN, Ling FS, Simlote P, Fernandez G, Rich DQ, Adler D, Gervase J, Cameron SJ. The platelet phenotype in patients with ST-segment elevation myocardial infarction is different from non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Transl Res*. 2018;195:1-12.

33. Adamski P, Buszko K, Sikora J, Niezgoda P, Baranska M, Ostrowska M, Paciorek P, Navarese EP, Gorog DA, Kubica J. Metabolism of ticagrelor in patients with acute coronary syndromes. *Sci Rep.* 2018;8(1):11746.
34. Adamski P, Sikora J, Laskowska E, Buszko K, Ostrowska M, Uminska JM, Sikora A, Skibinska N, Sobczak P, Adamska U, et al. Comparison of bioavailability and antiplatelet action of ticagrelor in patients with ST-elevation myocardial infarction and non-ST-elevation myocardial infarction: A prospective, observational, single-centre study. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186013.
35. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol.* 2014;51(4):759-74.
36. Provost P. Platelet MicroRNAs. In: Michelson AD, editor. *Platelets (Fourth Edition)*: Academic Press; 2019. p. 127-38.
37. Krammer TL, Mayr M, Hackl M. microRNAs as promising biomarkers of platelet activity in antiplatelet therapy monitoring. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
38. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008;451(7182):1125-9.
39. Shi R, Zhou X, Ji WJ, Zhang YY, Ma YQ, Zhang JQ, Li YM. The Emerging Role of miR-223 in Platelet Reactivity: Implications in Antiplatelet Therapy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:981841.
40. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, Hartmann T, Lackner KJ, Westermann D, Schnabel RB, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145930.
41. Cheng BJ, Nie XM, Zeng XL, Yuan H, Ma X, Zhao YX, Zhou YJ. [Expression of platelet miR-223 in coronary artery disease patients and its clinical significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2018;98(22):1766-70.
42. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, Sunderland NP, Willeit K, Morton AC, Armstrong PC, et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circ Res.* 2016;118(3):420-32.
43. Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res.* 2013;112(4):595-600.

44. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(4):290-9.
45. Barwari T, Eminaga S, Mayr U, Lu R, Armstrong PC, Chan MV, Sahraei M, Fernandez-Fuertes M, Moreau T, Barallobre-Barreiro J, et al. Inhibition of profibrotic microRNA-21 affects platelets and their releasate. *JCI Insight.* 2018;3(21).
46. Zhang Y, Liu YJ, Liu T, Zhang H, Yang SJ. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(2):323-9.
47. Lin S, Xu X, Hu H, Cheng J, Chen R, Hu Y, Chen X. The expression profile of platelet-derived miRNA in coronary artery disease patients with clopidogrel resistance. *Pharmacol Res Perspect.* 2021;9(2):e00751.
48. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
49. Dias JD, Pottgiesser T, Hartmann J, Duerschmied D, Bode C, Achneck HE. Comparison of three common whole blood platelet function tests for in vitro P2Y12 induced platelet inhibition. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;50(1):135-43.
50. Leng Q, Ding J, Dai M, Liu L, Fang Q, Wang DW, Wu L, Wang Y. Insights Into Platelet-Derived MicroRNAs in Cardiovascular and Oncologic Diseases: Potential Predictor and Therapeutic Target. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:879351.
51. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, Huntley RP, Lu R, Joshi A, Lovering RC, Mayr M. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens. *Circ Res.* 2017;120(2):418-35.
52. Costa F, van Klaveren D, James S, Heg D, Raber L, Feres F, Pilgrim T, Hong MK, Kim HS, Colombo A, et al. Derivation and validation of the predicting bleeding complications in patients undergoing stent implantation and subsequent dual antiplatelet therapy (PRECISE-DAPT) score: a pooled analysis of individual-patient datasets from clinical trials. *Lancet.* 2017;389(10073):1025-34.
53. Urban P, Mehran R, Colleran R, Angiolillo DJ, Byrne RA, Capodanno D, Cuisset T, Cutlip D, Eerdmans P, Eikelboom J, et al. Defining high bleeding risk in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a consensus document from the Academic Research Consortium for High Bleeding Risk. *Eur Heart J.* 2019;40(31):2632-53.
54. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol.* 2008;26(2):70-6.

55. Rakowski T, Siudak Z, Dziewierz A, Plens K, Kleczynski P, Dudek D. Contemporary use of P2Y(12) inhibitors in patients with ST-segment elevation myocardial infarction referred to primary percutaneous coronary interventions in Poland: Data from ORPKI national registry. *J Thromb Thrombolysis*. 2018;45(1):151-7.