

# Glükoosi pidurdav toime trombotsüütide agregatsiooni inhibeerimisele COXi inhibiitorite ja L-arginiiniga *in vitro*

Vilja Mardla<sup>1</sup>, Ebe Rooks<sup>2</sup>, Gennadi Kobzar<sup>1</sup>, Nigulas Samel<sup>1</sup>

Veresuhkru kõrge taseme puhul on täheldatud kalduvust trombotsüütide agregatsioonile ning trombotsüütide agregatsiooni pärssivad ravimid, kaasa arvatud aspiriin, pole piisavalt tõhusad trombotekke pidurdamisel. Vereglükoosi kõrge tase võib olla üheks aspiriiniresistentsust põhjustavaks teguriks. Töö eesmärk oli uurida tsüklooksügenaasi (COX) inhibiitorite ja L-arginiini toimet trombotsüütide agregatsioonile diabeedihaigetel ja tervetel lühiajalisel glükoosiga inkubeerimisel *in vitro*. Uuringust selgus, et glükoos pärssib COXi inhibiitorite ja L-arginiini mõju trombotsüütide agregatsioonile. Uuringu tulemused näitavad, et glükoos mõjutab kaht inhibiitorset biokeemilist rada trombotsüüdis: nii COXi kui ka L-arginiini NO-rada.

Eesti Arst 2014; 93(5):263–267

Saabunud toimetusse: 09.01.2014  
Avaldamiseks vastu võetud: 24.03.2014  
Avaldatud internetis: 30.05.2014

<sup>1</sup> Tallinna Tehnikaülikooli keemiainstituut, <sup>2</sup> Eesti Diabeedikeskus

Kirjavahetajaautor: Vilja Mardla vilja.mardla@ttu.ee

Võtmesõnad: trombotsüütide agregatsioon, aspiriiniresistentsus, COXi inhibiitorid, L-arginiin, glükoos

Aspiriin atsetüülilb pöördumatult ensüümi tsüklooksügenaasi (COX) aktiivtsentris oleva seriini hüdroksüülrühma, blokeerides trombooksaan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) produtseerimist trombotsüütide poolt, mis omakorda viib trombotsüütide agregatsiooni inhibeerimiseni. Le Guyader jt (1) näitasid, et vereglükoosi kõrge taseme korral ei pidurda aspiriin tromboteket. Sellist aspiriiniresistentsust võivad põhjustada mitmed tegurid. Nende hulka kuuluvad mitteküllaldane COX-1 ensüümi inhibeerimine, trombotsüütide retseptorite geneetiline polümorfism, trombotsüütide aktiveerimine COX-1 ensüümi alternatiivsete radade kaudu, COX-2 ensüümi indutseerimine, trombotsüütidest sõltumatu TxA<sub>2</sub> produktioon ning suur glükoosisisaldus veres (2–4).

## TÖÖ EESMÄRGID

A. Hinnata *in vitro* COXi inhibiitorite aspiriini ja indometatsiini mõju tervete isikute verest eemaldatud trombotsüütide agregatsioonile glükoosi erineva sisalduse korral trombotsüütidega plasmas või suspensioonis.

B. Hinnata *in vitro* aspiriini mõju diabeedihaigete verest eemaldatud trombotsüütide agregatsioonile.

C. Hinnata *in vitro* L-arginiini ja naatriumnitroprussiidi mõju nii diabeedihaigete kui ka tervete isikute verest eemaldatud trombotsüütide agregatsioonile.

## MATERJALID JA MEETODID

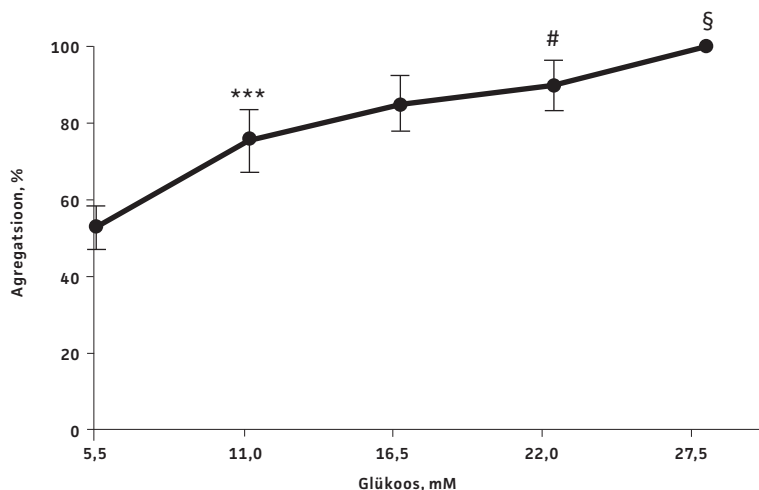
### Uuritavad

Uuringus osalesid terved vabatahtlikud (15 meest ja 12 naist) ja diabeedihaiget (4 meest ja 1 naine). Uuritavate vanus oli 22–67 aastat, keskmine vanus (45,7 ± 2,5). Diabeedihaigetel (2. tüüpi suhkurtõbi 4 patsienti; 1. tüüpi suhkurtõbi 1 patsient) oli glükoosi kontsentratsioon veres vahemikus 11,2–14,9 mmol/l (keskmine väärtus 13 ± 0,7 mmol/l). Glükoosi kontsentratsioon veres tervetel oli vahemikus 4,5–6,8 mmol/l (keskmine väärtus 5,6 ± 0,2 mmol/l). Uuritavad ei olnud tarvitanud aspiriini ega teisi põletikuvastaseid aineid vähemalt 10 päeva enne verevõtmist. Uuringuks oli olemas Tallinna meditsiiniuuringute eetikakomitee luba (nr 249; 18.04.2013).

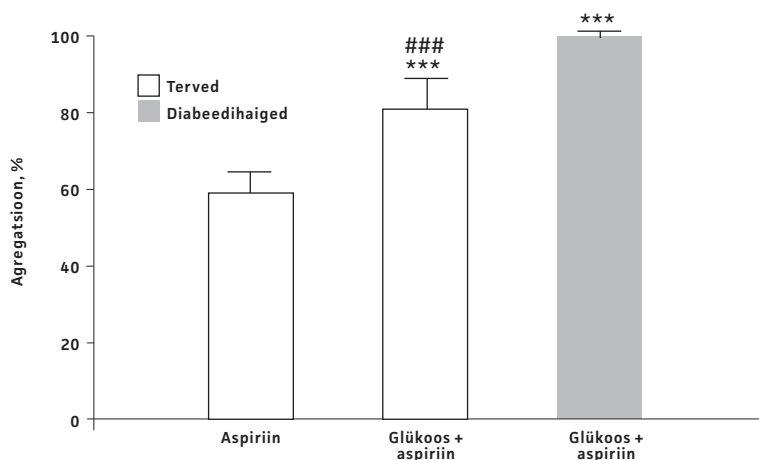
### Trombotsüütide eraldamine

Trombotsüüdirikas plasma (PRP) saadi tsitraadiga veenivere toatemperatuuril tsentrifuugimisel (10 min 160 x g). Pestud trombotsüütide suspensioon (WP) valmistati, kasutades meetodit (6), kus tarvitati EDTAd ja indometatsiini, et kaitsta trombotsüüte aktivatsiooni eest pesemisprotseduuri ajal. Lühidalt, 12 mM EDTAd ja 14 µM indometatsiini (lõppkontsentratsioon) lisati 4 ml PRP-le ning tsentrifuugiti (10 min 600 x g). Trombotsüütide tombuke resuspendeeriti

Tyrode kaltsiumivabas modifitseeritud lahuses, mis sisaldas 12 mM EDTAd ja 14  $\mu$ M indometasiini, ning retsentrifugeeriti (10 min 600 x g). Trombotsüütide kogum resuspendeeriti Tyrode modifitseeritud lahuses, mis sisaldas NaCl 136,9; KCl 2,68;  $MgCl_2$  1,05;  $NaHCO_3$  11,0;  $NaH_2PO_4$  0,42; HEPES



**Joonis 1.** Glükoosi suurenevate kontsentratsioonide pidurdav toime aspiriini inhibeerivale efektile adenosindifosfaadist (ADP) indutseeritud agregatsioonile 5 doonori trombotsüüdirikkas plasmas (PRP). PRPd inkubeeriti 15 min glükoosiga (11; 16,5; 22; 28 mM) enne aspiriini (0,2 mM) lisamist. Aspiriini lisati 1 min enne ADPd. ADP esile kutsutud agregatsioon on võetud 100 protsendiks. Vertikaaljooned näitavad standardhälvet (SD). \*\*\*  $p < 0,01$  vs. 5,5 mM; #  $p < 0,05$  vs. 11,0 mM; §  $p < 0,05$  vs. 16,5 mM.



**Joonis 2.** Aspiriini inhibeeriv efekt adenosindifosfaadist (ADPst) indutseeritud agregatsioonile 5 terve isiku trombotsüüdirikkas plasmas (PRP) ilma glükoosita ja glükoosi juuresolekul (valged tulbad). PRPd inkubeeriti 15 min glükoosiga enne aspiriini (0,2 mM) lisamist. Glükoosikontsentratsioon tervete PRPs on pärast glükoosi lisamist 13 mM. Aspiriini lisati 1 min enne ADPd. ADP esile kutsutud agregatsioon on võetud 100 protsendiks. Trombotsüütide agregatsioon glükoosi juuresolekul on  $81 \pm 8,0\%$  ja ilma glükoosita  $58,6 \pm 5,4\%$ . Vereglükoosi pidurdav toime aspiriini inhibeerivale efektile ADPst indutseeritud agregatsioonis 5 diabeedihaiage PRPs (hall tulp). Keskmise vereglükoosi kontsentratsioon diabeedihaiagete PRPs on  $13 \pm 0,7$  mM. Aspiriini lisati 1 min enne ADPd. Trombotsüütide agregatsioon on  $99,2 \pm 0,8\%$ . Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise ja standardhälbega (SD). \*\*\*  $p < 0,001$  vs. aspiriin; ###  $p < 0,001$  vs. glükoos + aspiriin (diabeedihaiaged).

15,0 mM ning mille pH oli 7,4. Fibrinogeeni (400  $\mu$ g/ml) ja  $CaCl_2$  (0,9 mM) (lõppkontsentratsioon) lisati suspensioonile enne agregatsiooni mõõtmist. Trombotsüüte loendati Swelabi rakuanalüsaatoriga ja nende arv viidi proovis  $250 \times 10^9$  rakuni liitri kohta.

## Trombotsüütide agrgatsiooni määramine

Trombotsüütide agregatsiooni mõõdeti Chrono-logi agregomeetriga. Agregatsiooni ulatust hinnati PRPs ja WPs fotomeetrilise meetodiga. Agregatsiooni küvett sisaldas 0,25 ml PRPd või WPd, mida hoiti 37 °C juures ja segati teflonkattega segajaga. Agregatsiooni indutseeriti adenosindifosfaadiga ADP. Submaksimaalne agregatsiooni amplituud võeti tulemuste väljendamisel 100 protsendiks ning trombotsüütide agregatsiooni inhibitsiooni määrati, inkubeerides PRPd või WPd COXi inhibiitorite ja L-arginiiniga. Glükoosi lisati 15 min enne COXi inhibiitorid, L-arginiini ja naatriumnitroprussiidi (SNP). COXi inhibiitorid, L-arginiini ja SNPd lisati 1 min enne ADP lisamist. Tulemused esitati aritmeetilise keskmise ja standardhälbega (SD). Statistiline analüüs tehti t-testiga või variatsioonianalüüsiga (ANOVA).

## TULEMUSED

Diabeedihaiagete verest eemaldatud trombotsüütidel ilmnes vähene spontaanne agregatsioon, tervete inimeste verest eemaldatud trombotsüütide spontaanne agregatsioon puudus 5minutilise jälgimisperioodi vältel.

Joonisel 1 on näidatud, et trombotsüütide inkubeerimine glükoosiga pidurdab aspiriini inhibeerivat toimet trombotsüütide agregatsioonile. Efekt sõltub glükoosi kontsentratsioonist trombotsüüdirikkas plasmas. Joonisel 2 on näha aspiriini agregatsiooni inhibeeriv toime ka diabeedihaiagete verest eemaldatud trombotsüütidele.

Glükoos pidurdab samuti pöörduva toimega COXi inhibiitori indometasiini pärssivat toimet trombotsüütide agregatsioonile (vt joonis 3). Samasugune glükoosi mõju aspiriini trombotsüütide agregatsiooni pidurdavale toimele ilmnes ka testis vereplasmast eemaldatud pestud trombotsüütidel (vt joonis 4). Kontrolltestid näitasid, et glükoos otseselt ei mõjuta trombotsüütide agregatsiooni trombotsüüdirikkas plasmas ega pestud trombotsüütide suspensioonis.

L-arginiin pärsib trombotsüütide agregatsiooni teise mehhanismiga kui COXi

ensüümi inhibiitorid. Glükoos pidurdab L-arginiini trombotsüütide agregatsiooni inhibeerivat mõju nii tervete isikute kui ka diabeedihaigete trombotsüüdirikkas plasmas (vt joonis 5). L-arginiini toimet uuriti koosmõjus prostatsükliini sünteetilise analoogi iloprostiga, glükoos viimase mõju agregatsioonile ei mõjutanud.

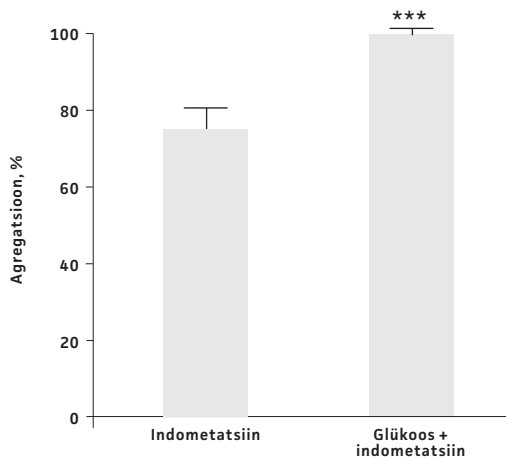
SNP trombotsüütide agregatsiooni inhibeeriv toime ei erine tervete isikute ja diabeedihaigete veres (vt joonis 6). Glükoos ei mõjuta SNP efekti.

## ARUTELU

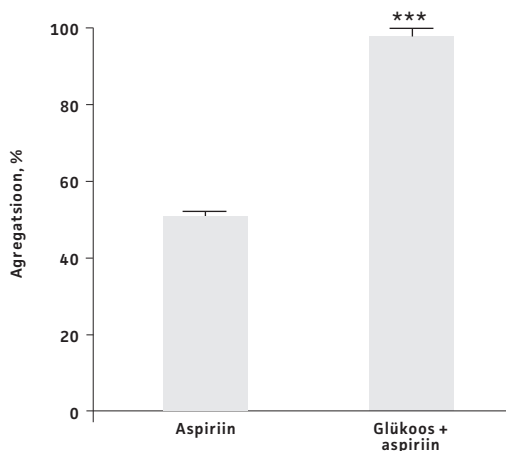
Kirjanduses on rohkesti andmeid, et vere-suhkru kõrge tase võib koronaar- ja diabeedihaigetel vähendada aspiriini trombotsüütide agregatsiooni pärssivat toimet (1, 8–10). Oleme varasemas uuringus näidanud, et aortokronaarse šunteerimise järel ei pärsi aspiriin enamikul koronaarhaigetel trombotsüütide agregatsiooni, kuid mõjusad on teised COXi inhibiitorid: nimesuliid, parasetamool, metamisool (11). Meie uuringu tulemused näitavad, et glükoos ei pärsi mitte ainult aspiriini, vaid ka pöörduva toimega COXi inhibiitori indometatsiini toimet trombotsüütidele (vt joonis 3).

Aspiriini trombotsüütide agregatsiooni pidurdava toime vähenemine glükoosikeskkonnas võib olla tingitud väiksema efektiivsusega atsetüülimisest trombotsüütidel. Watala jt väidavad, et trombotsüütide pikaajaline mõjutamine glükoosiga põhjustab nende mitteensümaatilist glükeerimist ja takistab seetõttu aspiriini toimet. Glükeerimine on aga pikaajaline protsess. Glükoosi mõju aspiriini toimele ei pruugi olla seotud ainult glükeerimisega, kuna glükoos toimib juba trombotsüütide lühiajalisel mõjutamisel 15 minuti jooksul (vt joonis 1, 4). Glükoosi efekt aspiriini antiagregatiivsele toimele trombotsüütidel võib lisaks glükoosi metabolismi produktidest sõltuda ka erinevate valkude mitteensümaatilise glükeerimisest veresuhkru kõrge taseme korral, mis võib omakorda põhjustada aspiriiniresistentsust diabeedihaigetel (12).

Uuringust selgus, et diabeedihaigete veres oli glükoosi pidurdav toime aspiriini efektile suurem kui tervete isikute vere lühiajalisel glükoosiga mõjutamisel (vt joonis 2). Seda erinevust võib põhjustada trombotsüütide pikaajaline kokkupuude diabeedihaigetel suurte glükoosikontsentratsioonidega, mis viib COXi ensüümi atsetüülimise efektiivsuse vähenemiseni.



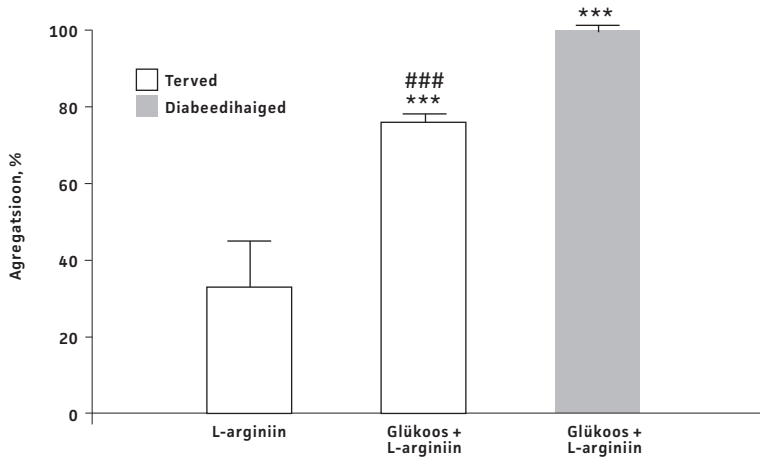
**Joonis 3.** Trombotsüütide adenosiindifosfaadist (ADPst) indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine indometatsiiniga tervete isikute trombotsüüdirikkas plasmas (PRP) glükoosi (22 mM) juuresolekul ja ilma glükoosita. PRPd inkubeeriti 15 min glükoosiga enne indometatsiini (0,08 mM) lisamist. Indometatsiini lisati 1 min enne ADPd. ADP esile kutsutud agregatsioon on võetud 100 protsendiks. Trombotsüütide agregatsioon indometatsiiniga ilma glükoosita on 76 ± 6,2% ja glükoosiga 99 ± 0,9%. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise ja standardhälbega (SD). \*\*\* p < 0,001 vs. indometatsiin.



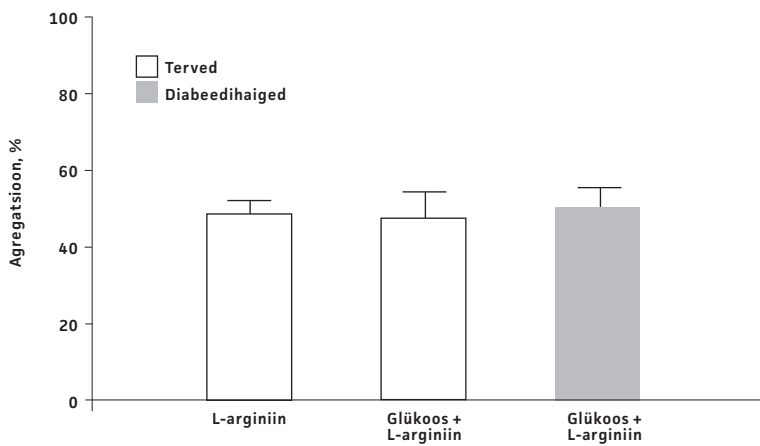
**Joonis 4.** Trombotsüütide adenosiindifosfaadist (ADPst) indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine aspiriiniga tervete isikute pestud trombotsüütide suspensioonis (WP) glükoosi juuresolekul (22 mM) ja ilma glükoosita. WPd inkubeeriti 15 min glükoosiga enne aspiriini (0,2 mM) lisamist. Aspiriini lisati 1 min enne ADPd. ADP indutseeritud agregatsioon on võetud 100 protsendiks. Trombotsüütide agregatsioon ilma glükoosita on 51,5 ± 1,3% ja glükoosiga 97,7 ± 2,6%. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise ja standardhälbega (SD). \*\*\* p < 0,001 vs. aspiriin.

Lisaks COXi ensüümile mõjutab glükoos ka L-arginiini NO-rada. Seda kinnitavad katsed L-arginiiniga (vt joonis 5). Diabeedihaigetel oli L-arginiini antiagregatiivne toime nõrgem kui tervetel sarnase lisatud glükoosi kontsentratsiooni (13 mM) juures. See võib olla tingitud glükoosi pikaajalisest kokkupuutest trombotsüütidega diabeedihaigetel. Diabeetikute veres on aktiveerunud ka vabade radikaalide produktsioon, mis võib mõjutada trombotsüütide NO-rada

(13). L-arginiinist tekkinud NO inhibeerib trombotsüütide agregatsiooni tsüklilise guanosiinmonofosfaadist (cGMP) sõltuva ja sõltumatu raja kaudu (14).



**Joonis 5.** L-arginiini inhibeeriv efekt adenosiindifosfaadist (ADP) indutseeritud agregatsioonile tervete isikute trombotsüüdirikkas plasmas (PRP) (valged tulbad). PRPd inkubeeriti 15 min glükoosiga enne L-arginiini (0,8 mM) lisamist. Arginiini ja iloprosti lisati 1 min enne ADPd. Glükoosi kontsentratsioon tervete PRPs on pärast glükoosi lisamist 13 mM. Iloprosti lisati lävikontsentratsioonis 0,02 nM, mis trombotsüütide agregatsiooni ei inhibeerib. Trombotsüütide agregatsioon L-arginiiniga glükoosi juuresolekul on  $75,7 \pm 2,2\%$  ja ilma glükoosita  $34 \pm 12,1\%$ . Vereglükoosi pidurdav toime L-arginiini inhibeerivale efektile ADPst indutseeritud agregatsioonis diabeedihaigete PRPs (hall tulp). Keskmine vereglükoosi kontsentratsioon diabeedihaigete PRPs on  $13 \pm 0,7$  mM. L-arginiini ja iloprosti lisati 1 min enne ADPd. Trombotsüütide agregatsioon L-arginiini juuresolekul on  $99,5 \pm 1,0\%$ . Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise ja standardhällbega (SD). \*\*\*  $p < 0,001$  vs. L-arginiin; ###  $p < 0,001$  vs. glükoos + L-arginiin (diabeedihaiged).



**Joonis 6.** Trombotsüütide adenosiindifosfaadist (ADPst) indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine naatriumnitroprussiidiga (SNP) 4 doonori trombotsüüdirikkas plasmas (PRP) glükoosi (13 mM) juuresolekul ja ilma glükoosita (valged tulbad). PRPd inkubeeriti 15 min glükoosiga enne SNP (8  $\mu$ M) lisamist. SNPd lisati 1 min enne ADPd. ADP põhjustatud agregatsioon on võetud 100 protsendiks. Trombotsüütide agregatsioon SNP juuresolekul on ilma glükoosita  $48 \pm 4,6\%$  ja glükoosiga  $47,3 \pm 7,3\%$ . Trombotsüütide ADPst indutseeritud agregatsiooni inhibeerimine 4 diabeedihaige PRPs (hall tulp). Vereglükoosi keskmine kontsentratsioon diabeedihaigetel on  $13 \pm 0,7$  mM. SNPd lisati 1 min enne ADPd. Trombotsüütide agregatsioon SNPga on  $49,0 \pm 7,0\%$ . Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise ja standardhällbega (SD). Väärtused statistiliselt oluliselt ei erine ( $p > 0,05$ ).

Uuringust selgus, et glükoos mõjutab L-arginiini efekti ADPst indutseeritud agregatsioonile (vt joonis 5), kuid ei mõjuta NO-doonori naatriumnitroprussiidide (SNP) efekti (vt joonis 6). Erinevus võib olla tingitud sellest, kas tegemist on cGMP-st sõltuva rajaga või mitte. Nimelt suurendab L-arginiin cGMP-taset trombotsüüdis, SNP toimib osaliselt ka cGMP-st sõltumatu raja kaudu. On teada, et aspiriin atsetüülib lisaks COX-i ensüümile ka NOS3 ensüümi (5, 15). NOS ensüümi aktiivsus on tihedalt seotud COX-i ensüümi funktsioneerimisega. Uuringus näitab, et glükoos mõjutab kaht inhibitoorset rada trombotsüüdis: nii COX-i kui ka L-arginiini NO-rada. Glükoosi toimemehhanism aspiriiniresistentsuse korral pole veel päris selge, kuna glükoos võib samal ajal mõjutada erinevaid biokeemilisi radu trombotsüütides.

Tang jt (16) esitasid hüpoteesi, et hüperglükeemia puhul aktiveeritakse vereliistakuid aldolaasreduktaasi raja kaudu, mis viib hapniku vabade radikaalide suurenenud produktsioonini, mis omakorda suurendab trombotsüütides TxA<sub>2</sub> vabanemist. Aspiriin ei suuda sellisel juhul enam pärssida TxA<sub>2</sub> teket ja trombotekke suureneb. COX-i ja NO radades võivad samuti olulist rolli mängida hapniku vabad radikaalid. Seega võivad vabad radikaalid osaleda ka glükoosi pidurdavas efektis COX-i inhibiitoritele ja L-arginiinile.

## JÄRELDUSED

Uuringu tulemused näitavad, et glükoos vähendab COX-i inhibiitorite aspiriini ja indometatsiini trombotsüütide agregatsiooni pidurdavat toimet *in vitro*. Pikaajaline trombotsüütide kokkupuude glükoosiga diabeedihaigetel pärsib rohkem aspiriini toimet kui lühiajaline glükoosiga kokkupuude katsetingimustes. Glükoos mõjutab ka L-arginiini trombotsüütide agregatsiooni inhibeerivat toimet. Glükoos ei mõjuta aga SNP toimet trombotsüütide agregatsioonile diabeedihaigetel ning see näitab SNP-tüüpi NO-doonorite võimalikku tähendust aspiriiniresistentsuse kujunemises diabeedihaigetel.

## TÄNUAVALDUS

Tööd on rahastanud Haridus- ja Teadusministeerium (sihtfinantseerimine nr SF0140010s08). Täname Põhja-Eesti Regionaalhaigla verekeskuse personali vereproovide kogumise eest.

## HUVIDE KONFLIKTI DEKLARATSIOON

Artikli autorid kinnitavad huvide konflikti puudumist seoses uuringu teostusega.

SUMMARY

**Glucose impairs inhibition of platelet aggregation by COX inhibitors and L-arginine**

Vilja Mardla<sup>1</sup>, Ebe Rooks<sup>2</sup>, Gennadi Kobzar<sup>1</sup>, Nigulas Samel<sup>1</sup>

**BACKGROUND.** Hyperglycaemia has been found to cause increased platelet activity and, as a result, antiplatelet drugs, including aspirin, suppress thrombi formation insufficiently. High blood glucose concentration might be one of the possible factors that cause aspirin resistance. Aspirin treatment reduces cardiovascular events incompletely in patients suffering from diabetes.

**AIM.** The main purpose of this study was to analyse the effect of glucose on the effect of COX inhibitors and L-arginine in platelets of healthy subjects and patients suffering from diabetes mellitus.

**METHODS.** Citrated venous blood was collected from healthy volunteers and from patients suffering from diabetes. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained after the centrifugation of citrated blood at 160 x g for 10 min at room temperature. The suspension of washed platelets (WP) was prepared as described previously using EDTA and indomethacin to protect the platelets from activation during the washing procedure. The platelets were counted in a Swelab cell counter and adjusted to a final concentration of 250 x 10<sup>9</sup> cells/L. Platelet aggregation was measured by a photometric method in a Chrono-Log aggregometer.

**RESULTS.** In healthy subjects, glucose added in PRP for 15 min impaired the aspirin inhibition of platelet aggregation induced by ADP in a concentration-dependent way. A similar effect was observed with another COX inhibitor, indomethacin, instead of aspirin. Also, glucose impaired L-arginine inhibition of platelet aggregation. Blood plasma was found to be not responsible for the effect of glucose on platelets. In the PRP of healthy subjects with normal concentration of glucose (5.6 mM), aspirin (0.2 mM) inhibited ADP-induced platelet aggregation

by 41 ± 5 % while with 13 mM of glucose the inhibition was only 19 ± 8 %. In patients suffering from diabetes, with 13 mM of glucose in blood, the same concentration of aspirin added *in vitro* in PRP had no noticeable effect on platelet aggregation. Glucose did not impair the inhibition of ADP-induced aggregation by sodium nitroprusside in the PRP of either healthy subjects or diabetic patients.

**CONCLUSION.** Glucose attenuates the effect of COX inhibitors and L-arginine on platelets. The results suggest that glucose impaired platelet aggregation inhibition through COX and L-arginine:NO pathway. Long-term exposure of glucose to platelets in diabetic patients has a stronger impeding effect on platelet inhibition caused by aspirin compared with short-term exposure of glucose in experimental conditions.

KIRJANDUS/REFERENCES

1. Le Guyader A, Pacheco G, Seaver N, et al. Inhibition of platelet GPIIb-IIIa and P-selectin expression by aspirin is impaired by stress hyperglycemia. *J Diabetes Complications* 2009;23:67-70.
2. Bhatt DL. Aspirin resistance: more than just laboratory curiosity. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1127-9.
3. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367:606-17.
4. Mardla V, Kobzar G. Inhibition of platelets with combination of natural agents. In: Synergistic effects of antiaggregants. Köln: Lambert Academic Publishing; 2009.
5. Kane PD, Reebye V, Ji Y, et al. Aspirin and clopidogrel treatment impair nitric oxide biosynthesis by platelets. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:223-9.
6. Takahara K, Murray R, FitzGerald GA, et al. The response to thromboxane A2 analogues in human platelets. Discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. *J Biol Chem* 1990;265:6836-44.
7. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990;101:325-8.
8. Yassine HN, Davis-Gorman G, Craig S, et al. Clinical determinants of aspirin resistance in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;90:e19-e21.
9. Davi G, Santilli G. Aspirin as antiplatelet agent in diabetes. *PROS- Eur J Intern Med* 2010;21:149-53.
10. Mortensen SB, Larsen SB, Grove EL, et al. Reduced platelet response to aspirin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2010;126:e318-22.
11. Mardla V, Rätsep I, Kobzar G, et al. COX inhibiitorite nimesuliidi, paratsetamooli ja metamisooli toime aspiriiniresistentsete koronaarhaigete trombotsüütidele enne ja pärast aortokoronaarset šunteerimist. *Eesti Arst* 2010;89:470-6.
12. Watala C, Pluta J, Golanski J, et al. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med* 2005;83:148-58.
13. Alexandru N, Popov D, Georgescu A. Platelet dysfunction in vascular pathologies and how can it be treated. *Thrombosis Research* 2012;129:116-26.
14. Priora R, Margarits A, Frosali S, et al. In vitro inhibition of human and rat platelets by NO donors, nitroglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. *Pharmacol Res* 2011;64:289-97.
15. Kane OP, Xie L, Liu Z, et al. Aspirin acetylates nitric oxide synthase type 3 in platelets thereby increasing its activity. *Cardiovasc Res* 2009;83:123-30.
16. Tang WH, Stitham J, Gleim S, et al. Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest* 2011;121:44672-6.

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Tallinn University of Technology, Tartu, Estonia, <sup>2</sup> Estonian Diabetes Centre, Tallinn, Estonia

Correspondence to: Vilja Mardla vilja.mardla@ttu.ee

Keywords: platelet aggregation, aspirin resistance, COX inhibitors, L-arginine, glucose