

THE FREQUENCY OF ASPIRIN RESISTANCE AND FACTORS ASSOCIATED WITH  
PLATELET RESPONSE TO ASPIRIN IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

Miss Purida Wientong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Care

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

ความถี่ของภาวะคือแอสไทรินและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อแอสไทริน  
ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2

นางสาว ภูริดา เวียนทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชาการบริหารทางเภสัชกรรม  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2549  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

492260

Thesis Title THE FREQUENCY OF ASPIRIN RESISTANCE AND FACTORS  
ASSOCIATED WITH PLATELET RESPONSE TO ASPIRIN IN  
TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

By Miss Purida Wientong

Filed of study Pharmaceutical Care (International Program)

Thesis Advisor Associate Professor Duangchit Panomvana Na Ayudhya, Ph.D.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Wallaya Jongjaroenprasert, MD.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Somkiat Sangwattanaoj, MD.

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of  
the Requirements for the Doctor's Degree

..... *Pornpen Pramyothin* ..... Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... *Achara Utiswannaikul* ..... Chairman  
(Associate Professor Achara Utiswannaikul, M.Sc. in Pharm.)

..... *Duangchit Panomvana* ..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Duangchit Panomvana Na Ayudhya, Ph.D.)

..... *Wallaya Jongjaroenprasert* ..... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Wallaya Jongjaroenprasert, MD.)

..... *Somkiat Sangwattanaoj* ..... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Somkiat Sangwattanaoj, MD.)

..... *Kunyada Nilaward* ..... Member  
(Associate Professor Kunyada Nilaward, Ph.D.)

..... *Pornanong Aramwit* ..... Member  
(Assistant Professor Pornanong Aramwit, Ph.D.)

..... *Vipaporn Panapisal* ..... Member  
(Vipaporn Panapisal, Ph.D.)

ภูริดา เวียนทอง : ความถี่ของภาวะคือแอสไพรินและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อแอสไพรินในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (THE FREQUENCY OF ASPIRIN RESISTANCE AND FACTORS ASSOCIATED WITH PLATELET RESPONSE TO ASPIRIN IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ดวงจิต พนมวัน ณ อยุธยา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. พญ. วลัยยา จงเจริญประเสริฐ, ผศ. นพ. สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ :120 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการตอบสนองต่อแอสไพรินในผู้ป่วยเบาหวาน หาคความถี่การคือต่อแอสไพริน และหาปัจจัยที่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อแอสไพริน โดยวัดการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับยาแอสไพริน 97 ราย และผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่ได้รับยาแอสไพริน 32 คน จากคลินิกผู้ป่วยนอกอายุรกรรม โรงพยาบาลรามาราชบดินี การรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดใช้วิธีออปติคัล โดยใช้กระดาษโคนิค 1 มิลลิเมตรต่อลิตร และเอ็ดที 10 ไมโครโมลต่อลิตรเป็นตัวกระตุ้น นิยามการคือต่อแอสไพรินคือค่าสูงสุดของการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย กรดอะราซิโคนิค มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 และค่าสูงสุดของการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยเอ็ดที มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 นิยามการตอบสนองของแอสไพรินบางส่วนคือ เข้าเกณฑ์ข้างต้นเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง วัดระดับชโรมบอเจนบี 2 ในซีรัมด้วยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์

ในผู้ป่วยเบาหวาน 97 คนที่ได้รับแอสไพริน มี 75 คนที่ได้รับยาขนาด 60 มิลลิกรัมต่อวัน 16 คนได้รับยาขนาด 300 มิลลิกรัมต่อวัน และ 6 คนได้รับขนาด 100-150 มิลลิกรัมต่อวัน ค่าเฉลี่ยการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยกรดอะราซิโคนิคและเอ็ดทีในผู้ป่วยที่ได้รับแอสไพรินมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับแอสไพรินอย่างมีนัยสำคัญ ( $17.71 \pm 17.99$  เปอร์เซ็นต์เทียบกับ  $79.34 \pm 7.34$  เปอร์เซ็นต์,  $p < 0.001$  และ  $61.76 \pm 9.16$  เปอร์เซ็นต์เทียบกับ  $72.09 \pm 8.26$  เปอร์เซ็นต์,  $p < 0.001$ ) ค่ากลางของชโรมบอเจนบี 2 ในซีรัมในกลุ่มที่ได้รับแอสไพรินมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับแอสไพรินอย่างมีนัยสำคัญ (0.189 (0.041-0.372) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ 5.526 (3.004-8.318) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร,  $p < 0.001$ ) ผู้ป่วยที่ได้รับแอสไพรินขนาด 60 มิลลิกรัมต่อวันมีค่าชโรมบอเจนบี 2 ในซีรัมสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาขนาด 300 มิลลิกรัมต่อวัน (0.27(0.08-0.54) เทียบกับ 0.05 (0.01-0.13),  $p < 0.001$ ) แต่ค่าการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผู้ป่วย 6 คน (ร้อยละ 6.19) คือต่อแอสไพริน ผู้ป่วย 25 คน (ร้อยละ 25.77) ตอบสนองบางส่วน และ 66 คน (ร้อยละ 68.04) ตอบสนองคือต่อแอสไพริน การคือต่อแอสไพรินไม่สัมพันธ์กับเพศ อายุ น้ำตาลในเลือด ไขมันรวมในเลือด หรือประวัติโรคหัวใจและหลอดเลือด การศึกษานี้ชี้ว่าแอสไพรินขนาด 60-300 มิลลิกรัมต่อวันสามารถยับยั้งการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานไทยส่วนใหญ่ได้ และยานี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นยาต้านเกร็ดเลือดตัวแรกในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต..... *Purida Wientong*  
 สาขาวิชา.....การบริบาลทางเภสัชกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Dungchit Panon*  
 ปีการศึกษา...2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *Walia Jit*  
 ..... *Savitree Payetwanj*

# # 4576966433 : MAJOR PHARMACEUTICAL CARE

KEY WORD: ASPIRIN / ASPIRIN RESISTANCE / DIABETES / TYPE 2 DIABETES / PLATELET

PURIDA WIENTONG : THE FREQUENCY OF ASPIRIN RESISTANCE AND FACTORS ASSOCIATED WITH PLATELET RESPONSE TO ASPIRIN IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DUANGCHIT PANOMVANA NA AYUDHYA, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. WALLAYA JONGJAROENPRASERT, MD., ASST. PROF. SOMKIAT SANGWATTANAROJ, MD.120 pp.

The purpose of this study were to investigate whether use of aspirin in patients with type 2 diabetes has desired antiplatelet effects, to determine frequency of aspirin resistance and to identify factors associated with platelet response to aspirin. Platelet function of 97 patients with type 2 DM on chronic aspirin therapy and 32 type 2 DM aspirin-free patients who attended the medical outpatient clinic, Ramathibodi hospital, was assessed by optical aggregometry using 1 mmol/l arachidonic acid (AA) and 10 μmol/l adenosine diphosphate (ADP) as agonists. Aspirin resistance was defined as a maximum aggregation of > 20% with AA and a maximum aggregation of > 70% with ADP. Aspirin semiresponders were defined as meeting one, but not both of the above criteria. Serum thromboxane (TX) B<sub>2</sub> levels were assayed by enzyme immunoassay (EIA) technique.

Of 97 diabetic patients who were treated with aspirin, 75 were treated with 60 mg/d, 16 were treated with 300 mg/d and 6 patients were treated with 100-150 mg/d. Mean ± SD. of platelet aggregation induced by AA and ADP in patients with aspirin was significantly lower than those with no aspirin (17.71 ± 17.99% vs.79.34 ± 7.34%, p<0.001 and 61.76 ± 9.16% vs. 72.09 ± 8.26%, p<0.001). Median (interquartile range) serum TXB<sub>2</sub> level in aspirin group was significantly lower than those in non-aspirin group (0.189 (0.041-0.372) ng/ml vs 5.526 (3.004-8.318) ng/ml, p<0.001). Patients with 60 mg/d aspirin had significantly higher level of serum TXB<sub>2</sub> compared with 300 mg group (0.27(0.08-0.54) vs 0.05 (0.01-0.13), p<0.001), but platelet aggregation was not significantly different. Six (6.19%) of patients were aspirin resistance, 25 (25.77%) were aspirin semiresponders and 66 (68.04%) were aspirin sensitive patients. Aspirin resistance was not related to gender, age, blood glucose, total cholesterol, or a history of cardiovascular disease. The results suggest that 60-300 mg/d aspirin can inhibit platelet aggregation in most Thai patients with diabetes and is a reasonable first-line antiplatelet agent in patients with type 2 diabetes.

Department.....Student's signature..... *Purida Wientong*  
Field of study...Pharmaceutical Care.....Advisor's signature..... *Duangchit Panomvana*  
Academic year...2006.....Co-advisor's signature: *Walla Jongsart*

*Somkiat Sangwattana*

## ACKNOWLEDGMENTS

This study had been accomplished by the collaboration of many wonderful persons. First of all, I wish to express my sincere appreciation to my major advisor, Associate Professor Dr. Duangchit Panomvana, for her full support and guidance throughout my dissertation studies. Her professional judgment and advices have contributed immensely to the completion of this study. Special gratitude is felt for Assistant Professor Wallaya Jongjaroenprasert, Sub-division of endocrinology, faculty of medicine, Ramathibodi hospital, my co-advisor, for her valuable support, helpful discussion and kindness. I am equally grateful to Assistant Professor Somkiat Sangwattanaoj, Subdivision of cardiology, faculty of medicine, Chulalongkorn hospital, my co-advisor, for his constructive comments and suggestions.

My sincere thanks go to all staffs, fellowships, and officers of sub-division of endocrinology, Ramathibodi hospital, including Dr. Pornsiri Sirithunyanont, fellowship of sub-division of endocrinology, for giving me very helpful support and wonderful friendship. I am very grateful to Ms. Napaporn Archararit and Ms. Katcharin Ayurachai, sub-division of hematology, Ramathibodi hospital for their great assistance and laboratory support.

I would like to thank all the patients and volunteers, who kindly participated in the study, without their cooperation, this study would not have been possible. I am particularly thankful to the Faculty of Graduate studies, Chulalongkorn University, for the dissertation grant. My special thanks are extended to my family and my friends for their love, support and encouragement that inspired me to succeed this study.

## CONTENTS

	<b>Page</b>
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Rationale and Significance of the Problem.....	1
1.2 Objectives.....	5
1.3 Scope of the Study.....	5
1.4 Operational definition.....	6
CHAPTER II REVIEW OF LITERATURE.....	7
2.1 Platelets and Thrombosis.....	7
2.2 Evaluation of Platelet Function.....	12
2.3 Thromboxane Synthesis.....	14
2.4 Platelets in Diabetes Mellitus.....	16
2.5 Aspirin.....	17
2.6 Aspirin Resistance.....	20
CHAPTER III METHODOLOGY.....	30
3.1 Subjects.....	30
3.2 Data Collection.....	31
3.3 Laboratory Assays.....	32
3.4 Data Analysis.....	33
CHAPTER IV RESULTS.....	34
4.1 Patient Characteristics.....	34
4.2 Effect of Aspirin on Platelet Aggregation.....	40
4.3 Effect of Aspirin on Serum Thromboxane B <sub>2</sub> .....	49

**CONTENTS**

	<b>Page</b>
4.4 Aspirin Resistance.....	56
4.5 Factors Influencing Platelet Response to Aspirin.....	69
CHAPTER V DISCUSSION.....	76
5.1 Effect of Aspirin on Platelet Aggregation and Serum Thromboxane B <sub>2</sub> in Type 2 Diabetes.....	76
5.2 Prevalence of Aspirin Resistance in Type 2 Diabetic Patients.....	77
5.3 Factors Influencing Platelet Response to Aspirin in Diabetic Patients....	80
5.4 Management of aspirin resistance.....	82
5.5 Study Limitations.....	82
CHAPTER VI CONCLUSION.....	84
REFERENCES.....	85
APPENDICES.....	93
APPENDIX A.....	93
APPENDIX B.....	98
APPENDIX C.....	102
BIOGRAPHY.....	120



## LIST OF TABLES

	<b>Page</b>
Table 1 Characteristics of the subjects.....	37
Table 2 Health behaviors.....	38
Table 3 Co-morbid conditions.....	38
Table 4 Medications.....	39
Table 5 Dosage of aspirin.....	40
Table 6 Dosage of aspirin in primary and secondary prevention.....	41
Table 7 Dosage of aspirin in cardiovascular disease.....	41
Table 8 Aspirin dosage and platelet aggregation induced by arachidonic acid.....	47
Table 9 Aspirin dosage and platelet aggregation induced by ADP.....	49
Table 10 Aspirin dosage and thromboxane level.....	53
Table 11 Patient demographics in aspirin resistances, aspirin semiresponders, and aspirin sensitives.....	60
Table 12 Patient health behavior in aspirin resistances, aspirin semiresponders, and aspirin sensitives.....	61
Table 13 Co-morbid conditions in aspirin resistances, aspirin semiresponders, and aspirin sensitives.....	61
Table 14 Co-medication in aspirin resistances, aspirin semiresponders, and aspirin sensitives.....	62
Table 15 Biochemical parameters in aspirin resistances, aspirin semiresponders, and aspirin sensitives.....	63
Table 16 Dosage of aspirin in aspirin resistances, aspirin semi-responders and aspirin sensitives.....	64
Table 17 Statistics of platelet aggregation in patients with aspirin resistant and aspirin sensitive with arachidonic acid.....	64
Table 18 Demographics of aspirin resistant and aspirin sensitive with arachidonic acid.....	65

	<b>Page</b>
Table 19 Co-morbid conditions of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin group by resistant to arachidonic induced platelet aggregation.....	65
Table 20 Medications of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to arachidonic acid induced platelet aggregation.....	66
Table 21 Clinical data of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to arachidonic induced platelet aggregation.....	67
Table 22 Statistics of platelet aggregation in patients with aspirin resistant and aspirin sensitive with arachidonic acid.....	68
Table 23 Demographic data of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to ADP induced platelet aggregation.....	68
Table 24 Co-morbid conditions of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to ADP induced platelet aggregation.....	69
Table 25 Medications of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to ADP induced platelet aggregation.....	69
Table 26 Clinical data of 97 type 2 diabetic patients taking aspirin grouped by resistant to ADP induced platelet aggregation.....	69
Table 27 Means percentage of platelet aggregation induced by arachidonic acid and ADP in aspirin group divided by gender of patients.....	71
Table 28 Correlation coefficient of demographic characteristics and platelet aggregation induced by arachidonic acid and ADP.....	72
Table 29 Correlation coefficient of health behavior and mean aggregation induced by arachidonic acid and ADP.....	73
Table 30 Correlation coefficient of co-morbid conditions and platelet aggregation induced by arachidonic acid and ADP.....	74

	<b>Page</b>
Table 31 Correlation coefficient of co-medication and platelet aggregation induced by arachidonic acid and ADP.....	75
Table 32 Correlation coefficient of blood glucose and platelet aggregation induced by arachidonic acid in asa group.....	77
Table 33 Statistics of mean serum thromboxane B <sub>2</sub> in type 2 diabetic non-aspirin treated group and type 2 diabetic aspirin treated group.....	95

## LIST OF FIGURES

	<b>Page</b>
Figure 1 Mechanism of platelet activation.....	11
Figure 2 The biosynthesis of thromboxane A <sub>2</sub> .....	15
Figure 3 Mean % platelet aggregation induced by arachidonic acid in type 2 diabetic patients with no aspirin and with aspirin group.....	41
Figure 4 Distribution of platelet aggregation induced by arachidonic acid in diabetic patients with no aspirin.....	42
Figure 5 Distribution of platelet aggregation induced by arachidonic acid in diabetic patients with aspirin.....	42
Figure 6 Mean % platelet aggregation induced by ADP in type 2 diabetic patients with no aspirin and with aspirin group.....	43
Figure 7 Distribution of platelet aggregation induced by ADP in diabetic patients with no aspirin.....	44
Figure 8 Distribution of platelet aggregation induced by ADP in diabetic patients with aspirin.....	44
Figure 9 Distribution of platelet aggregation induced by arachidonic acid in 60 mg/d aspirin group.....	46
Figure 10 Distribution of platelet aggregation induced by arachidonic acid in 300 mg/d aspirin group.....	46
Figure 11 Distribution of platelet aggregation induced by ADP in 60 mg/d aspirin group.....	48
Figure 12 Distribution of platelet aggregation induced by ADP in 300 mg/d aspirin group.....	48
Figure 13 Distribution of serum thromboxane B <sub>2</sub> levels in diabetic patients with no aspirin.....	49
Figure 14 Distribution of thromboxane B <sub>2</sub> levels in diabetic patients with aspirin.....	50

	<b>Page</b>
Figure 15 Serum thromboxane B <sub>2</sub> levels in type 2 diabetic patients with no aspirin and with aspirin group.....	50
Figure 16 Median serum thromboxane B <sub>2</sub> level of type 2 diabetic patients who received different dosage of aspirin.....	52
Figure 17 The relationship between serum thromboxane B <sub>2</sub> and arachidonic acid induced platelet aggregation in non-aspirin group.....	53
Figure 18 The relationship between serum thromboxane B <sub>2</sub> and arachidonic acid induced platelet aggregation in aspirin group.....	53
Figure 19 The relationship between serum thromboxane B <sub>2</sub> level and ADP induced platelet aggregation in non-aspirin group.....	54
Figure 20 The relationship between serum thromboxane B <sub>2</sub> and ADP induced platelet aggregation in aspirin group.....	55
Figure 21 Frequency of aspirin resistance.....	56

**LIST OF ABBREVIATIONS**

AA	Arachidonic acid
ACEIs	Angiotensin converting enzyme inhibitors
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosine diphosphate
ARBs	Angiotensin receptor blockers
ASA	Aspirin
BMI	Body mass index
BP	Blood pressure
CAD	Coronary artery disease
CCB	Calcium channel blocker
COX	Cyclooxygenase
CVA	Cerebrovascular disease
DAG	Diacylglycerol
DBP	Diastolic blood pressure
dL	Diciliters
DM	Diabetes mellitus
et al.	et alii (and others)
FPG	Fasting plasma glucose
g	grams
GP	Glycoprotein
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Hemoglobin A1c
Hct	Hematocrit
HDL	High-density lipoprotein
HOMA	Homeostatic model assessment
hr	Hours
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IR	Insulin resistance
kg	Kilograms
LDL	Low-density lipoprotein
mg	Milligrams

mg/d	Milligrams per day
MI	Myocardial infarction
min	Minutes
ml	Milliliters
mmHg	millimeter mercury
mmol/l	Millimole per liter
MPV	Mean platelet volume
n	Number of patients
NO	Nitric oxide
NS	Not significant
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
p	p-value
P25	25 <sup>th</sup> percentile
P75	75 <sup>th</sup> percentile
PFA	Platelet function analyzer
PG	Prostaglandin
r	Pearson's correlation coefficient
SBP	Systolic blood pressure
SD	Standard deviation
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TC	Total cholesterol
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxane B <sub>2</sub>
TZD	Thiazolidinedione
µg	Micrograms
µm	Micrometers
µL	Microliters
vs	Versus
vWF	Von Willebrand factor