

I 1375
XVI 171
KNIP
1992

BEÏNVLOEDING VAN ARTERIËLE THROMBOSE

Een kwantitatieve studie

K50



B. Knippenberg

1375

BEÏNVLOEDING VAN ARTERIËLE THROMBOSE

Een kwantitatieve studie.

Bibli theek

GAUBIUS INSTITUUT D'NO

Gezondheidsinst. v. d. N.

Prinses 812

6113 10 11 - 11 11

13/15

STELLINGEN

behorende bij het proefschrift

BEÏNVLOEDING VAN ARTERIËLE THROMBOSE

Een kwantitatieve studie.

B. Knippenberg

1. Morfometrie is onontbeerlijk bij het kwantificeren van de invloed van geneesmiddelen op arteriële thrombose in het aortaflapmodel.
2. In het aortaflapmodel bestaat een directe relatie tussen het volume van de thrombus enerzijds en het volume van de flap en het resterend lumenoppervlak anderzijds.
3. Onder invloed van het plaatjesremmende acetylsalicylaat neemt het thrombusvolume in het aortaflapmodel sterker af dan met het anti-coagulans warfarine.
4. Thromboseremming met acetylsalicylaat dient prae-operatief te worden aangevangen.
5. In toekomstige trials dient acetylsalicylaat in lage dosering toegediend te worden.
6. De vroege doorgankelijkheid van perifere overbruggingsplastieken wordt mede bepaald door de haematocriet.
7. Het bepalen van de resectie- c.q. anastomoseplaats van de darm na een mesenteriaalinfarct dient te geschieden op basis van het fluorescentiepatroon van het darmoppervlak na intraveneuze toediening van natrium-fluorescine.
8. Spinale anaesthesie leidt bij patiënten met een hoog risico (ASA klasse 4-5) tot een hogere mortaliteit dan algehele anaesthesie bij vergelijkbare operaties.

9. De obturator-bypass is het beste therapeutische alternatief bij het ischaemische been ten gevolge van een in de lies gelocaliseerde ernstige weke delen beschadiging of infectie.
10. Korte veneuze stenosen in haemodialysefistels kunnen eenvoudig worden behandeld met een percutane transluminale angioplastiek.
11. Een biochemische oorzaak voor verhoogde galsteenvorming bij mannelijke juveniele insuline-afhankelijke diabetes-patiënten is niet aangetoond.
12. De mate van peri-operatieve bloedtransfusie bij de resectie van colorectale levermetastasen is gecorreleerd aan de prognose van de patiënt.
13. De late kans op een maligniteit in de urinewegen na aanvankelijk negatief urologisch onderzoek wegens recidiverende haematurie is sterk vergroot.
14. Voor de overleving van Antarctica verdient het ernstig aanbeveling dit continent met onmiddellijke ingang de status te geven van "beschermde natuurpark".

Leiden, 5 april 1989.

BEÏNVLOEDING VAN ARTERIËLE THROMBOSE

Een kwantitatieve studie.

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van Doctor aan de Rijksuniversiteit te Leiden, op gezag van de Rector Magnificus Dr. J.J.M. Beenakker, hoogleraar in de faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen, volgens besluit van het college van dekanen te verdedigen op woensdag 5 april 1989, te klokke 14.15 uur.

door

BOB KNIPPENBERG,
geboren te Hoek van Holland in 1951.

Promotiecommissie

Promotor : Prof.Dr. J.L. Terpstra

Referenten : Dr. J.J. Emeis

Prof.Dr. J. Sixma,
Rijksuniversiteit te Utrecht

Overige leden : Prof.Dr. A.E. Meinders

Prof.Dr. A. Zwaveling

Het experimentele onderzoek werd verricht in het Gaubius Instituut,
Hoofdgroep Gezondheidsonderzoek TNO, Leiden.

De uitgave van dit proefschrift werd mede mogelijk gemaakt door een
financiële bijdrage van Hoechst Pharma, Amsterdam.

Aan mijn ouders

José

Niels

Sven

BEÏNVLOEDING VAN ARTERÏELE THROMBOSE

I N H O U D

<u>Hoofdstuk 1</u>	<u>Inleiding.</u>	pag. 9
<u>Hoofdstuk 2</u>	<u>Arteriële thrombose en experimenteel model.</u>	
2.1	De rol van plaatjes.	11
2.2	De rol van de stolling.	13
2.3	De invloed van de vaatwand.	15
2.4	Fibrinolyse.	17
2.5	De invloed van de bloedstroom.	17
2.6	Relatie thrombose - aortaflapmodel.	23
<u>Hoofdstuk 3</u>	<u>Het effect van farmaca op de thrombus.</u>	
3.1	Inleiding.	24
3.2	Keuze van de farmaca voor thrombusremming.	24
3.3	Acetylsalicylaat.	25
3.4	Ticlopidine.	39
3.5	Warfarine.	43
3.6	Plasminogeenactivator.	51
<u>Hoofdstuk 4</u>	<u>Experimenteel model.</u>	
4.1	Het aortaflapmodel.	54
4.2	De samenhang met de vaatchirurgie.	56
<u>Hoofdstuk 5</u>	<u>Materiaal en methoden.</u>	
5.1	Operatie en microchirurgische methode.	67
5.2	Protocol.	68
5.3	Methode van opoffering, perfusie-fixatie en inbedding.	68
5.4	Snijprocedure.	70
5.5	Kleuring.	70
5.6	Morfometrie.	71

5.7	Dosering.	pag. 73
5.8	Behandelingsschema's.	74
5.9	Macroscopie en microscopie (uitval).	79
5.10	Histologie.	81
5.11	Voorbeeld van de bewerking van een proefdier.	83
<u>Hoofdstuk 6</u>	<u>Resultaten.</u>	
6.1	Normotesten, haematologische en plasmaparameters.	90
6.2	Berekeningen controlegroep; berekeningsmodellen.	93
6.3	Resultaten van de behandelde groepen.	97
6.4	Het effect van aggregatieremmers en antistolling op het thrombusvolume.	101
6.5	Het effect van t-PA op het thrombusvolume.	114
6.6	Samenvatting van de resultaten.	123
<u>Hoofdstuk 7</u>	<u>Discussie.</u>	124
<u>Hoofdstuk 8</u>	<u>Conclusies.</u>	136
<u>Hoofdstuk 9</u>	<u>Samenvatting.</u>	138
<u>Hoofdstuk 10</u>	<u>Summary.</u>	144
<u>Hoofdstuk 11</u>	<u>Referenties.</u>	149
	<u>Lijst van afkortingen.</u>	177
	<u>Curriculum vitae.</u>	178

HOOFDSTUK 1 - INLEIDING

Thrombusvorming op een arteriewand kan door vernauwing of afsluiting van een vat leiden tot klinische beelden met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Goede voorbeelden hiervan zijn het myocardinfect, het cerebrovasculaire accident (CVA) en de perifere vasculaire ziekten, die bijna altijd voorkomen op basis van atherosclerose.

De mate van thrombose op een atherosclerotische vaatwand is niet goed bekend; wel is duidelijk, dat acute afsluitende thrombi tot ernstige complicaties kunnen leiden, maar ook niet-afsluitende thrombi kunnen ernstige gevolgen hebben, zoals bijvoorbeeld embolisering. Gezien de variabiliteit van de klinische beelden, is het niet eenvoudig om het effect van thrombose remmende middelen op de frequentie van klinische complicaties weer te geven.

Over de resultaten van de vele experimentele en klinische studies naar het effect van medicatie op thrombose, is nog steeds een uitgebreide discussie gaande.

Hiervoor kan een aantal verklaringen gegeven worden:

Ten eerste zijn, merkwaardig genoeg, vrijwel geen experimentele gegevens voorhanden over het effect van stollingsremmende middelen op arteriële thrombose, terwijl juist deze middelen klinisch zeer uitgebreid en langdurig toegepast worden bij vele vormen van vaatpathologie in de verschillende orgaansystemen.

Over plaatjesremmende middelen zijn daarentegen zeer veel gegevens bekend, die echter niet goed met elkaar te vergelijken zijn door het gebruik van verschillende in vivo en in vitro modellen bij verschillende species.

Ten tweede ontbreken vaak de juiste kwantitatieve gegevens omdat de metingen plaatsvinden aan de hand van indirecte c.q. afgeleide parameters. Zo worden experimenteel bijvoorbeeld gegevens gehanteerd als het percentage thrombusoppervlak bij lichtmicroscopie, de embolisatie ratio en de temperatuurmeting en klinisch bijvoorbeeld het voorkomen van recidief infarcten, het beïnvloeden van claudicatio intermittens en het verminderen van de mortaliteit.

Ten derde correleren laboratoriumgegevens (zoals stollings- en aggregatietests) en de in vitro experimenten slecht met de kliniek.

Ten vierde zijn zowel de invasiviteit als de duur van de klinische onderzoeken zwaarwegende nadelen.

Door deze beperkingen is analyse van medicamenteuze beïnvloeding van arteriële thrombose tot op heden nog steeds van zeer groot belang.

Een experimenteel model zou derhalve aan de volgende voorwaarden moeten voldoen: Het dient een in vivo model te zijn, waarbij in een arterie een thrombus wordt opgewekt op een thrombogene stenose onder invloed van een pulsatiele stroom. Deze thrombus dient histologische overeenkomsten te vertonen met de humane thrombus en het stollings- en fibrinolytisch systeem van het proefdier dient overeen te komen met dat van de mens. Daarnaast dient de experimentele methode minimaal invasief te zijn, dat wil zeggen zonder gebruikmaking van ingrijpende procedures met catheters of andere vreemde lichamen.

Op basis van deze voorwaarden is in dit onderzoek gekozen voor het "aortaflapmodel" bij de rat: Juist in dit model treedt de genoemde plotselinge en complexe verandering van de bloedstroom op in aanwezigheid van een thrombogene stenose, terwijl het stollingsmechanisme van mens en rat overeenkomen. Het aortaflapmodel vertoont overeenkomsten met de humane pathologie en met atherosclerose in het bijzonder. Daarnaast wordt aan de veranderde bloedstroom in aanwezigheid van een thrombogene stenose een belangrijke rol toebedacht in de etiologie van atherosclerose en het optreden van complicaties (zoals een ruptuur in een atherosclerotische plaque in een coronairarterie of de aanwezigheid van een vaatnaad).

Het doel van deze studie is om vast te stellen in welke mate plaatjesremmende middelen (acetylsalicylaat en ticlopidine) en orale anticoagulantia (warfarine) effect hebben op experimentele arteriële thrombose en in welke dosering deze middelen het meest effectief zijn, direct en kwantitatief gemeten aan de thrombus zelf. Analoog hieraan wordt de therapeutische invloed van weefseltype-plasminogeenactivator (t-PA) bestudeerd.

HOOFDSTUK 2 - ARTERIËLE THROMBOSE EN EXPERIMENTEEL MODEL

Bij arteriële thrombose spelen verschillende factoren een rol, die moeilijk afzonderlijk te beschouwen zijn. Hieronder zullen deze factoren worden besproken.

2.1 - DE ROL VAN PLAATJES

Adhaesie van plaatjes aan het vaatwandoppervlak gaat vooraf aan het aggregatieproces, waarbij plaatjes zich met elkaar verbinden. Deze plaatjesadhaesie op subendotheel is een complex proces, waarbij plaatjesreceptoren, subendotheliale structuren, plasma-eiwitten en bloedstroom een rol spelen.

In het subendotheel zijn collageen en fibronectine in sterke mate betrokken bij de plaatjesadhaesie. In de bloedstroom dragen schuifkrachten en het aantal plaatjes en erythrocyten bij tot de plaatjesadhaesie.

Ook de op het subendotheel aanwezige Factor VIII-Von Willebrand factor draagt bij aan de plaatjesadhaesie. Op het plaatjesoppervlak spelen glycoproteïnecomplexen een rol bij de adhaesie en komen meerdere specifieke receptoren voor die, na binding met een stimulus, een complex vormen, dat leidt tot het belangrijke mechanisme van de mobilisatie van intracellulaire calciumionen. Voorbeelden van deze stimuli zijn onder meer het thrombine, het collageen, het adenosinedifosfaat (ADP) en de platelet-activating factor (PAF).

Door mobilisatie van calciumionen uit het "dense tubular system" in het plaatje, stijgt de cellulaire calciumconcentratie (plaatjesactivatie), waarna via de actine-myosine interactie plaatjescontractie ("shape change") en de "release reactie" optreden. Bij deze plaatjesactivatie vindt tevens inductie plaats van de thromboxaansynthese (White et al. - 1978, De Gaetano - 1981, Verstraete - 1982, Packham - 1983, Vermijlen - 1986).

Een belangrijk proces bij de "release reactie" is het uitstoten van aggregatie-inducerende stoffen door plaatjesgranula (Holmsen - 1975).

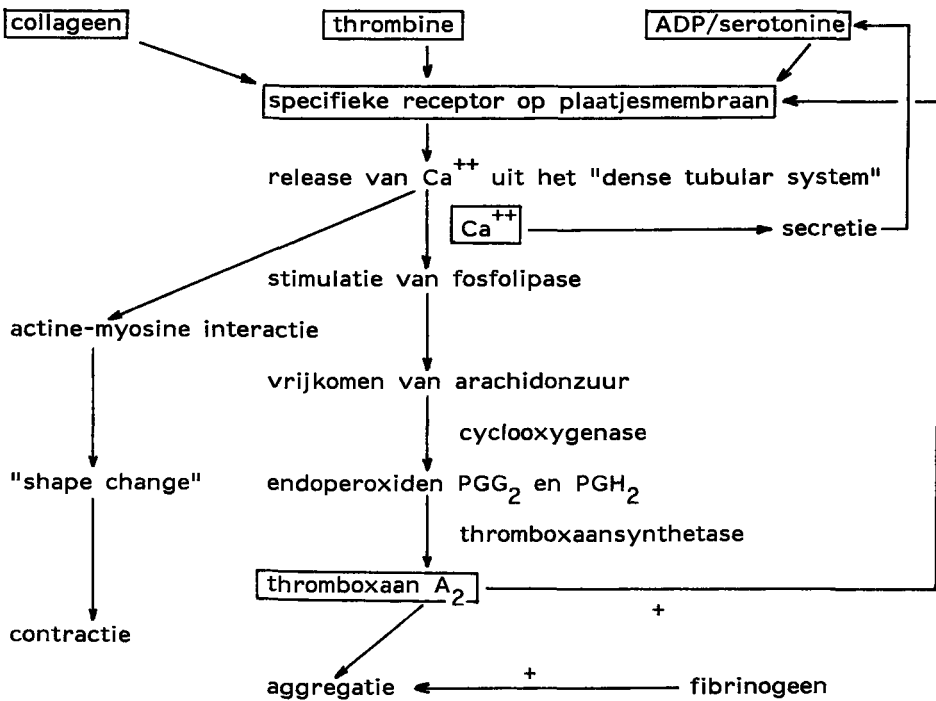
Het plaatje bevat drie vormen van granula:

- de "dense bodies" (met een electronenmicroscopisch dichte structuur), die ADP, adenosinetrifosfaat (ATP), serotonine, catecholaminen en calciumionen bevatten

- de "alpha-granula" (minder electronendicht), die onder meer anti-plasmine, een chemotaxie- en celgroei-bevorderende factor ("platelet derived growth factor") alsmede fibrinogeen, fibronectine en beta-thromboglobuline bevatten; tevens treedt "release" op van plaatjes-factor IV (PF4), dat sterk heparine-neutraliserend werkt
- lysosomen

Door zowel het vrijkomen van ADP en serotonine uit de "dense bodies" als door de thromboxaansynthese wordt de thrombusvorming via een feedback-mechanisme versterkt. Normaal plasma bevat geen meetbare PF4 of beta-thromboglobulinen uit de alpha-granula, zodat deze stoffen als een marker voor plaatjesactivatie en -secretie worden beschouwd (Pepper - 1979, Vermijlen - 1986).

Het proces van de plaatjesactivatie kan als volgt worden weergegeven:



Plaatjesaggregatie is afhankelijk van twee extracellulaire cofactoren: calciumionen en fibrinogeen (White et al. - 1978). Tijdens de aggregatie ondergaat het plaatje een vormverandering, waarbij de discoïde celvorm overgaat in een bolvorm met pseudopodiën en de plaatjes aan elkaar vast gaan kleven. Het fibrinogeen bindt zich aan de geactiveerde receptoren en vormt bruggen tussen de plaatjes.

Fosfolipasen worden eveneens tijdens de "release reactie" geactiveerd en klieven het arachidonzuur van de membraanfosfolipiden (Smith - 1976). Het aldus vrijgekomen arachidonzuur wordt onder invloed van het cyclo-oxygenase omgezet in de endoperoxiden prostaglandine- G_2 en - H_2 (PGG₂ en PGH₂). Het PGH₂ wordt onder invloed van thromboxaansynthetase omgezet in thromboxaan A₂ (Hamberg et al. - 1974, Mustard - 1981, Vermijlen - 1986). Thromboxaan A₂ is een zeer sterke stimulator van de plaatjesaggregatie en de "release reactie", terwijl de intermediären PGG₂ en PGH₂ deze processen in mindere mate stimuleren (Hamberg et al. - 1975).

ADP en thromboxaan A₂ geven een heftige aggregatiereactie, waarbij het thrombine (gevormd onder invloed van het geactiveerde stollingsproces) zowel de plaatjesmassa stabiliseert als tot verdere aggregatie bijdraagt. Fibrinogeen polymeriseert tot fibrine, vormt een netwerk rond de plaatjethrombus en behoedt de instabiele aggregaten voor afbraak en uiteenvallen.

2.2 - DE INVLOED VAN DE STOLLING

Het membraan van geactiveerde plaatjes neemt actief deel aan de catalyse van de thrombineproductie, waardoor aggregatie en stolling onlosmakelijk met elkaar verbonden zijn.

In dit proces spelen membraanfosfolipiden (waaronder fosfatedylserine en fosfatedylethanolamine) een centrale rol. De fosfolipiden bevinden zich in het niet-geactiveerde plaatje aan de cytoplasmatische zijde en in het geactiveerde plaatje aan de buitenzijde van het membraan.

Deze "omdraaiing" van fosfolipiden van binnen naar buiten, de zogenaamde "flip-flop-reactie" wordt veroorzaakt door collageen en thrombine tezamen. De bij de "release reactie" uit het plaatje vrijkomende Factor V, het geactiveerde fosfolipidenmembraan en de zich daarop bevindende geactiveerde Factor X vormen het prothrombinasecomplex. Dit complex zet

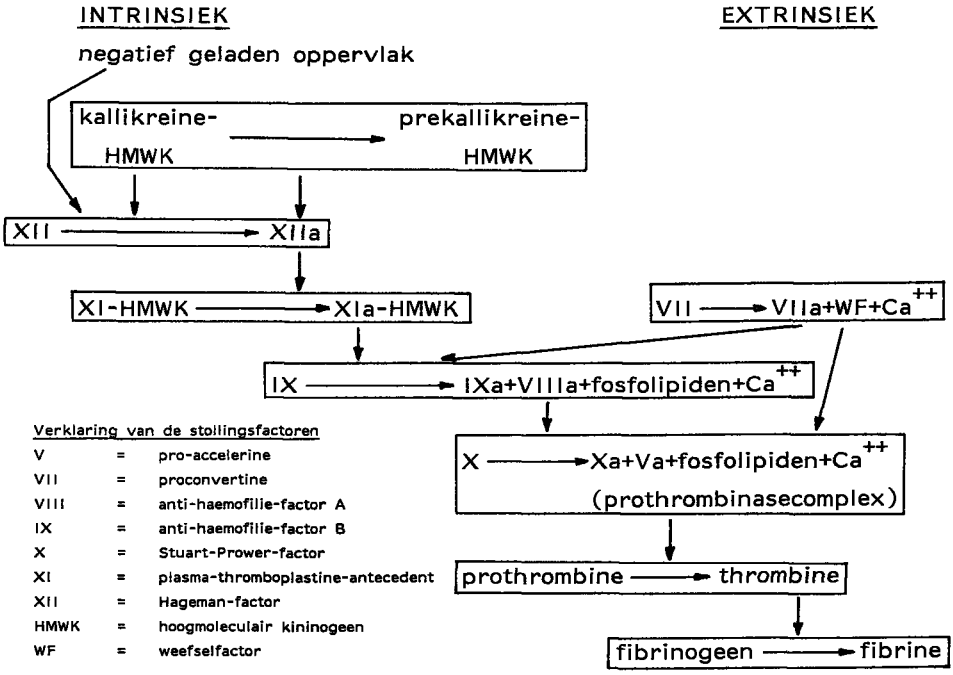
prothrombine zeer snel om in thrombine, veel sneller dan in plasma alleen (Zwaal et al. - 1982). Daarnaast wordt de plaatjesgebonden stolling niet beïnvloed door het in plasma aanwezige antithrombine III (Miletich et al. -1978).

Een beschadigde vaatwand neemt op twee manieren deel aan de vorming van thrombine:

- door initiëren van de intrinsieke stolling via het blootliggende collageen, waardoor factor XII (de Hageman-factor) wordt geactiveerd (Niewarowski - 1966, Nemerson et al. - 1982), en
- omdat het weefselthromboplastine de extrinsieke stolling activeert (Nemerson et al. - 1972).

De interactie tussen bloedstolling en plaatjesaggregatie leidt tot vorming van fibrine. De fibrine-stabiliserende factor XIII wordt geactiveerd door thrombine en stabiliseert de thrombus door "crosslinking" van de fibrine-monomeren.

Hieronder is het stollingsproces schematisch weergegeven, waarbij eveneens de rol van de fosfolipiden is weergegeven.



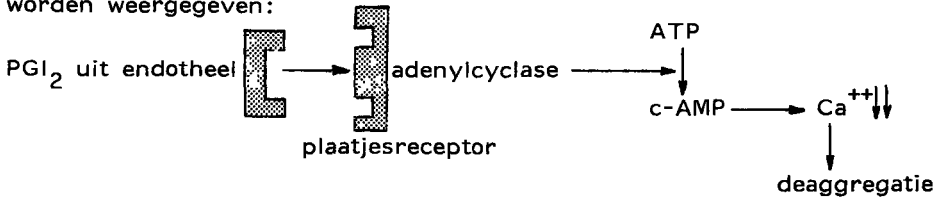
2.3 - DE INVLOED VAN DE VAATWAND

Veranderingen in de vaatwand treden op door beschadiging van het anti-thrombotisch endotheel, zoals door anoxie, roken, virale infectie, homocysteïne en immunologische afwijkingen (Mustard - 1981). De meest voorkomende vaatwandveranderingen zijn de -al dan niet met endotheel beklede- atherosclerotische plaques. Naast collageen, bevat het subendotheel componenten, die niet voorkomen in een normale vaatwand (zoals cholesterolkristallen, necrotische cellen en "low density" lipoproteïnen) en aanleiding kunnen geven tot plaatjesactivatie en stolling (Haust - 1971). Bij een ruptuur van een atherosclerotische plaque zou door bloeding in de plaque ADP uit de erythrocyten vrij kunnen komen en tot plaatjesactivatie kunnen leiden (Born - 1963). Het is niet duidelijk, welke van de genoemde componenten van de plaque de belangrijkste rol spelen in de plaatjesactivatie.

Intact endotheel heeft een thromboseremmende functie door binding en inactivering van thrombine en door activering van zowel proteïne C (een eiwit, dat na activatie door thrombine de stolling remt door afbraak van Factor V en VIII) als de prostacyclinesynthese (prostaglandine $I_2=PGI_2$). Prostacycline remt zowel de plaatjesaggregatie als (in hoge concentratie) de plaatjesadhaesie en heeft tevens een sterke vasodilaterende werking (Moncada et al. - 1976). Prostacycline is (evenals thromboxaan in de plaatjes) een metaboliet van arachidonzuur, dat voornamelijk voorkomt in de fosfolipiden van celmembranen (Sitsen et al. - 1983). Aangenomen wordt, dat de productie van prostacycline niet beïnvloed wordt door de endoperoxiden in de plaatjes (Hornstra et al. - 1979). In arterieel en veneus weefsel werd prostacycline-activiteit aangetoond door in vitro remming van de plaatjesaggregatie onder invloed van arachidonzuur (Moncada et al. - 1977). Door meting van 6-keto-prostaglandine- $F1\alpha$, een stabiele metaboliet van prostacycline in de urine, kon de mate van prostacyclineproductie aangetoond worden (Patrignani et al. - 1982).

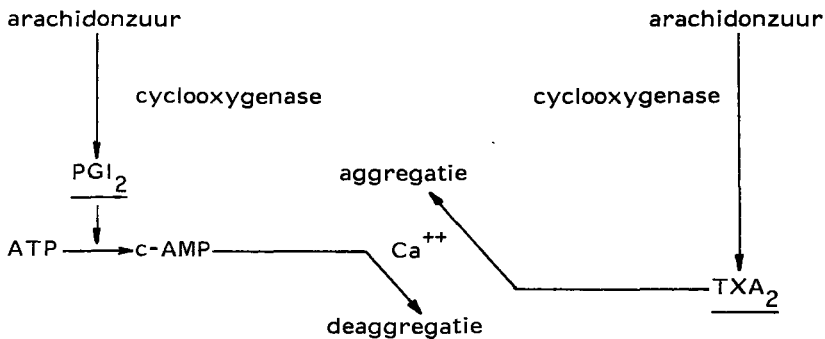
De prostacyclineproductie is maximaal in de intima en neemt af in de richting van de adventitia. Daarentegen neemt de aggregatiestimulerende werking van het subendotheel toe in de richting van de adventitia. Deze tegengestelde werking maakt de endotheelbekleding anti-aggregatoir en de adventitia zeer thrombogeen (Moncada et al. - 1977).

Het werkingsmechanisme van prostacycline berust op remming van plaatjesaggregatie door stimulatie van adenylyclase. Hierdoor stijgt het cyclisch adenosine monofosfaat (c-AMP) in de plaatjes, dat resulteert in een afname van de concentratie calciumionen, waardoor de plaatjesaggregatie geremd wordt (Vane et al. - 1980). Dit proces kan als volgt schematisch worden weergegeven:



Sommige auteurs beschouwen het prostacycline als een circulerend hormoon, waarvan meer dan de helft bij infundering in de aorta één circulatie overleeft en tijdens de passage door de long niet wordt geïnactiveerd. Anderen beschouwen prostacycline daarentegen als een lokaal werkend hormoon omdat de prostacyclineconcentratie in circulerend bloed te laag is om plaatjesadhaesie te kunnen remmen (Cazenave et al. - 1973, Sitzen - 1983). Aangezien prostacycline een instabiele substantie is, moet de continue aanwezigheid ervan echter op voortdurende aanmaak berusten. De balans tussen de prostacyclineproductie in het endotheel en de thromboxaanproductie in de plaatjes wordt van belang geacht bij de vorming en groei van de thrombus enerzijds en de (mogelijk daarmee samenhangende) ontwikkeling van atherosclerose anderzijds (Gryglewski - 1976, Dyerberg et al. - 1978).

De balans tussen prostacycline- en thromboxaanproductie wordt in onderstaand schema verduidelijkt:



2.4 - FIBRINOLYSE

Het ontstaan en de grootte van een thrombus worden bepaald door de balans tussen thrombogenese en thrombolysse. Lysis van een fibrinenetwerk maakt het aggregaat instabiel en leidt tot uiteenvallen ervan, zodat fibrinolysse zowel de plaatjesmassa als het fibrinenetwerk van thrombi doet verdwijnen (Marsh - 1981).

Van de proteolytische enzymen, die fibrine afbreken, is plasmine de belangrijkste. Dit enzym circuleert in de vorm van het inactieve pro-enzym plasminogeen, dat door andere proteasen (de plasminogeenactivatoren) geactiveerd wordt tot plasmine. In bloed komen drie typen functioneel en immunologisch verschillende plasminogeenactivatoren voor, waarvan weefseltype-plasminogeenactivator (t-PA) voor de thrombolysse de belangrijkste is. Dit enzym wordt door het endotheel geproduceerd en in actieve vorm in het bloed uitgescheiden.

De activatie van plasminogeen tot plasmine door t-PA wordt in sterke mate gestimuleerd door fibrine, zodat deze activatie niet in de circulatie, maar -praktisch gesproken- alleen op een fibrinestolsel plaatsvindt. Op basis van deze eigenschap is t-PA bij uitstek geschikt voor fibrinolytische therapie, omdat t-PA (dat zich bovendien sterk aan fibrine bindt) vooral effect heeft op het fibrinenetwerk van een thrombus. De twee overige in het bloed voorkomende plasminogeenactivatoren zijn plasma-pro-urokinase en een contactactivatie-afhankelijke pro-activator, die (in tegenstelling tot t-PA) op hun beurt via een nog onbekend mechanisme tot plasminogeen-activator geactiveerd worden. In de urine komt een actieve, aan plasma pro-urokinase verwante plasminogeenactivator voor: het urokinase (Barlow et al. - 1972, Astrup - 1978).

Over de rol van de fibrinolysse bij het oplossen van bestaande arteriële thrombi onder fysiologische omstandigheden is nog weinig bekend. Wel is bij veneuze thrombose beschreven, dat een te laag niveau van fibrinolytische activiteit thrombusbevorderend werkt (Nillson - 1985).

2.5 - DE INVLOED VAN DE BLOEDSTROOM

Naast de bovenbeschreven veranderingen in bloedsamenstelling en vaatwand, zijn de grootte, de plaats en de samenstelling van de thrombus afhankelijk van de snelheid van de bloedstroom als fysische factor. Zo

bestaat een veneuze thrombus hoofdzakelijk uit fibrine en erythrocyten en een arteriële thrombus voornamelijk uit plaatjes en een weinig fibrine. De bloedstroom wordt voornamelijk beïnvloed door zowel atherosclerotische plaques als bifurcaties en stenosen.

Bij een bloedstroomsnelheidsvermindering en ter plaatse van stenosen met turbulentie komen meer plaatjes in contact met de vaatwand en neemt de aggregateneiging toe (Goldsmith et al. - 1975). Bij een toegenomen bloedstroomsnelheid kunnen plaatjesaggregaten ontstaan door een toeneming van de schuifkrachten en de diffusieverschijnselen, die bij beschadiging van het endotheel tot thrombusvorming kunnen leiden. Door de interactie van bloedstroom en thrombus kunnen plaatjes vervolgens door de schuifkrachten losbreken en naar distaal emboliseren. Om deze reden zal een occlusieve thrombus in een arterie niet zo eenvoudig ontstaan, behoudens op die plaatsen, waar de bloedstroom ernstig wordt gehinderd of tot stilstand komt (Mustard - 1981, Goldsmith - 1986).

De factoren die de bloedstroom en derhalve de thrombusvorming beïnvloeden zijn: snelheid (en de daarvan afgeleide "shear stress" en "shear rate"), turbulentie en viscositeit.

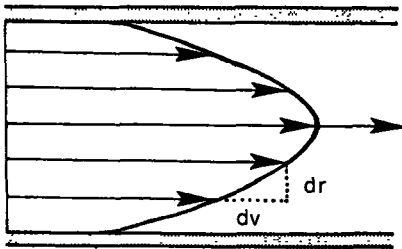
Hieronder volgt een korte beschrijving van de begrippen shear stress, shear rate, turbulentie en viscositeit. Voor de uitgebreide theoretische aspecten van de bloedstroom en de effecten ervan op thrombose en haemostase wordt verwezen naar "Stroming in slagaderen" van J. de Boer (1978) en het ICTH-rapport "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis; basic principles and applications" van Goldsmith en Turitto (1986).

Shear stress (afschuifspanning: T) wordt gedefiniëerd als de wrijvingskracht tussen de verschillende evenwijdige vloeistoflagen, zich bewegend door een gladde buis. De viscositeit van deze vloeistof uit zich door het optreden van wrijvingsverschijnselen tussen deze lagen, uitgedrukt in de formule:

$$T = n \frac{dv}{dr}$$

In deze formule is T de shear stress (Pascal) en n de dynamische viscositeit (Pascal.sec), die voornamelijk afhankelijk is van de temperatuur.

De shear rate (snelheidsgraadient dv/dr in sec^{-1}) is de snelheidsverandering per verschil in afstand ten opzichte van de vaatwand (De Boer - 1978) (zie figuur 1).



Figuur 1

Turbulentie en viscositeit

Men spreekt van turbulente stroming, wanneer de bloedstroomsnelheid zodanig toeneemt, dat een onregelmatig wervelende beweging van de vloeistofdelen ontstaat, in tegenstelling tot een laminaire stroming, waarin alle deeltjes van het bloed evenwijdig aan de vaatwand bewegen. Voor Newtonse vloeistoffen, zoals plasma, geldt het Reynolds-getal, een dimensieloze grootheid van 2300, waarbij laminaire stroming omslaat in een turbulent stroompatroon:

$$Re = \frac{V_{gem} \cdot d}{\nu}$$

Dit getal is afhankelijk van de gemiddelde stroomsnelheid (V_{gem}), de kinematische viscositeit (ν) en de diameter van de buis (d). Door aanwezigheid van partikels (voornamelijk erythrocyten) is bloed een niet-Newtonse vloeistof. Er blijkt een toenemende kinematische viscositeit bij een stijgende haematocriet en een niet-lineaire relatie tussen shear stress en shear rate. Bij lage snelheid blijkt in grote vaten een hoge en in kleine vaten een lage viscositeit.

Beschrijving van de vloeistofdynamica in de circulatie wordt bemoeilijkt aangezien de aan de laminaire visceuze vloeistofstromen ontleende wetten niet toepasbaar zijn op een biologisch systeem met een pulsatiele stroming in een niet-Newtonse vloeistof in een zich vertakkend en gebogen vaatbed.

Bloedstroomeffecten

De bloedstroomsnelheid beïnvloedt het ontstaan en de vorm van murale thrombi.

Bij een gedeëndothelialiseerde arterie in een perfusiekamer had Baumgartner (1973) bij een wijde opening een hogere bloedstroomsnelheid nodig om een thrombus op te wekken dan bij een nauwe opening. In dit model bleken plaatjesadhaesie en thrombusvorming op subendotheel sterk afhankelijk te zijn van de "shear rate". De plaatjesadhaesie wordt bij "shear rates" van minder dan 1000 sec^{-1} voornamelijk bepaald door diffusieverschijnselen (het botsen van de partikels), terwijl de adhaesie bij hogere "shear rates" in toenemende mate wordt beïnvloed door de kracht van de chemische interacties. Bij "shear rates" van minder dan 200 sec^{-1} worden geen thrombi gezien, tussen de $200-1000 \text{ sec}^{-1}$ worden tijdelijke ("transient") thrombi gezien, terwijl de vorming van murale thrombi boven de 1000 sec^{-1} sterk toeneemt (Turrito et al. - 1979).

Experimenteel toonde Goldsmith (1974) aan, dat de door thrombine geïnduceerde "release reactie" in bloedsuspensies toeneemt onder invloed van door oscillatie opgewekte "shear rates" van meer dan 2000 sec^{-1} . Dit ef-

fect werd nog versterkt door toevoeging van adrenaline en calciumionen. Door de snelheidstoename van de bloedstroom treedt dus potentiëring van de aggregatie op.

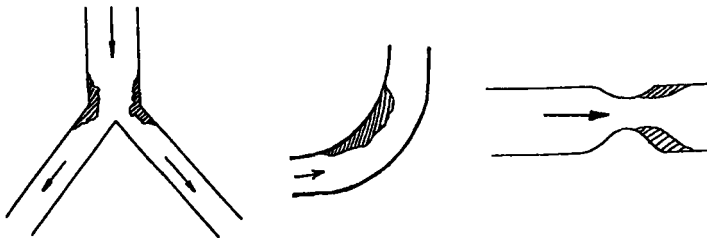
In arteriosclerotisch gestenoseerde arteriën komen afschuifspanningen van 200 tot 400 Pascal voor, waardoor een heftige aggregatiereactie optreedt. Experimenteel blijkt, dat de door "shear" geïnduceerde plaatjes-"release reactie" en de daaropvolgende stabiliteit van het aggregaat sterk afhankelijk zijn van de Von Willebrand factor en de membraanglycoproteïnen IB en IIB-III A (Loscalzo et al. - 1986, Weiss et al. - 1986).

De plaatjesadhaesie en -aggregatie blijkt, naast de "shear rate", tevens bepaald te worden door diffusieverschijnselen (dat wil zeggen fysische factoren), die aanleiding geven tot plaatjestransport naar de periferie van de stroom (naar het vaatwandoppervlak toe). Dit effect op de plaatjes wordt versterkt door de aanwezigheid van erythrocyten (Turrito et al. - 1979, Bell et al. - 1984, Remuzzi et al. - 1985, Goldsmith et al. - 1986). De door erythrocyten veroorzaakte botsingen geven aanleiding tot snellere bewegingen van onder meer de plaatjes, hetgeen leidt tot verhoogde plaatjesdiffusie en toenemende botskrachten tussen plaatjes en vaatwandoppervlak, resulterend in een toenemende adhaesie. De adhaesie neemt eveneens toe bij een stijging van de haematocriet of de plaatjesconcentratie. Wat de plaatjesconcentratie betreft, geldt dit tot een zekere plateauwaarde, die afhankelijk is van het met plaatjes bedekte subendotheloppervlak en het aantal plaatjes dat het oppervlak bereikt, zich hecht en daar vervolgens weer van loskomt (Remuzzi et al. - 1985).

Concluderend zijn de bloedstroomsnelheid en de aanwezigheid van erythrocyten bepalend voor de frequentie waarmee plaatjes in contact komen met het vaatwandoppervlak. In hoeverre adhaesie en aggregatie optreden, is afhankelijk van de thrombogeniciteit van het vaatwandoppervlak, de reactiviteit van de plaatjes alsmede van de schuifkrachten, die de plaatjes trachten te verplaatsen.

Vormfactoren in relatie tot de bloedstroomsnelheid

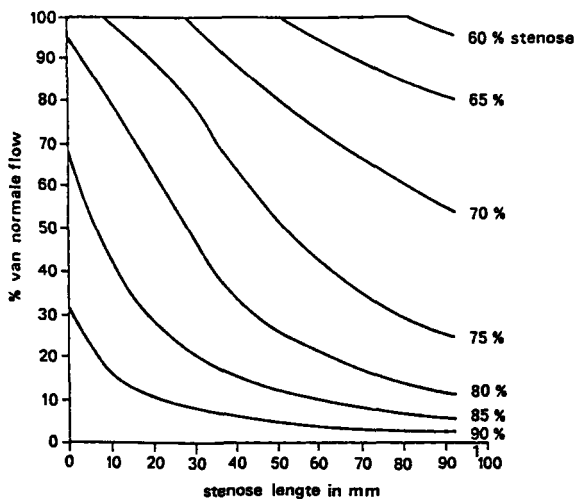
Plaatjethrombi komen voornamelijk voor ter plaatse van bifurcaties en bochten in het vaatstelsel en zetten zich bij voorkeur af aan de buitenzijde van bifurcaties en aan de binnenzijde van bochten alsmede ter plaatse van stenosen (zie figuur 2).



Figuur 2

Het vóórkomen van deze aggregaten wordt verklaard door werveling en wisselende "shear rates" in de grenslaag (Goldsmith - 1974, Liepsch et al. - 1981). Achter een wandonregelmatigheid c.q. stenose ontstaat door "flow contraction" een "doodwaterzone", waarin turbulentie kan optreden onder invloed van zowel de grootte en vorm van de stenose als de stroomsnelheid van het bloed.

Door een stenose ontstaat, afhankelijk van de stenosegraad en de lengte van de stenose, plaatselijk een toeneming van de bloedstroomsnelheid. Onder het begrip "kritische arteriële stenose" wordt die minimumwaarde van de lumendiameter verstaan, waaronder een kleine vermindering van dit oppervlak een plotselinge vermindering van de doorstroming van het vat veroorzaakt (zie figuur 3).



Figuur 3 - De relatie bloedstroomsnelheid en stenosegraad (diameter) en de lengte van de stenose (uit: "Stroming in slagaderen" van J. de Boer).

In de literatuur bestaat vaak verwarring over het begrip "stenose"; enerzijds wordt gesproken over een vermindering van de lumendiameter, anderzijds over een vermindering van het lumenoppervlak. De bloedstroom is nog net normaal bij een diameterafneming van 60%, overeenkomend met een oppervlakte-afneming van 84%; de bloedstroom is tot een kritische waarde verlaagd bij een diameterafneming van 84%, wat correspondeert met een oppervlakte-afneming van 96% (Archie et al. - 1981).

Een stenose beïnvloedt de vorm van de bloedstroom, waardoor mechanische endotheelbeschadigingen optreden. Door Gertz et al. (1981) werd in een konijnmodel door een ligatuur een focale stenose van 40 tot 60% van de lumendiameter van de a. coronaria en a. carotis aangebracht. Met electromagnetische meting van de bloedstroomsnelheid werd geen ernstige stroomverandering vastgesteld. Zij constateerden echter wel ernstige endotheelbeschadigingen in de vorm kratervorming, fragmentatie en desquamatie alsmede thrombusvorming, met name op de proximale helling van de stenose. De voorkeurslocalisatie van de endotheeldesquamatie ter plaatse van de proximale helling en de afwezigheid van deze endotheelbeschadiging bij een verminderde stroomsnelheid suggereren een mechanisch effect van het bloed ter plaatse van de acute vernauwing. Endotheelbeschadiging en thrombusvorming kunnen derhalve voorkomen ter plaatse van een focale arteriële vernauwing, zelfs indien de transluminale diameter onvoldoende afneemt om de bloedstroomsnelheid te kunnen reduceren.

Deze observaties correleren met de bevindingen van Fry (1968), die uitgebreide endotheelbeschadiging vaststelde indien de "shear stress" bij een stenose van een arterie 379 ± 85 Pascal benaderde.

In een pulsatiele stroom zijn schuifkrachten praktisch niet te berekenen omdat het exacte snelheidsprofiel in het arteriële lumen niet bekend is. De toeneming in "shear rates" is echter aanzienlijk groter bij een pulsatiele bloedstroom dan bij een continue bloedstroom (Goldsmith et al. - 1986). De reeds genoemde bevindingen van Turrito et al. (1979), die stelden dat de groei van thrombi afhankelijk was van de bloedstroomsnelheid (en "shear rate"), komen in die zin met de bovenbeschreven resultaten van Gerz en Fry overeen, dat de experimenteel maximaal bereikbare "shear rate" van 10.000 sec^{-1} een equivalent is van een schuifkracht van 200 tot 400 Pascal, waarbij het endotheel afschuift.

Na het aanbrengen van diameterversnauwende (60-80%) plastic ringen in de coronairarteriën van honden, constateerden Folts et al. (1982) een afneming van de bloedstroom, die echter in de tijd bleek te wisselen. Het wisselen van de bloedstroom werd toegeschreven aan de accumulatie van plaatjesaggregaten op de stenosen; deze aggregaten braken na enige tijd weer los, waarna de bloedstroom weer toenam. Onder invloed van acetylsalicylaat (ASA) konden deze wisselingen worden voorkomen. Heparinisatie bleek geen invloed te hebben op het cyclisch flowveranderingspatroon en topische toediening van papaverine en nitroglycerine (vasodilatatie) vòòr de stenose evenmin. Hieruit blijkt de primaire rol van de plaatjes bij thrombose onder invloed van de bloedstroom.

Het is duidelijk, dat toeneming van de "shear stress" door stenosering van een arterie kan leiden tot plaatselijke, wandstandige thrombusvorming. Deze thrombusvorming treedt vooral op ter plaatse van de proximale helling van de stenose, waar de schuifkrachten grote veranderingen ondergaan. Daarnaast kan door turbulentie en sedimentatie in de "doodwaterzone" achter een stenose eveneens thrombusvorming optreden.

2.6 - RELATIE THROMBOSE - AORTAFLAPMODEL

In het voorgaande werd de rol van de plaatjes, de stolling, de fibrinolyse, de vaatwand en de fysische factoren in het thrombotisch proces besproken. In het aortaflapmodel van Van Aken (1982) worden deze factoren teruggevonden door de aanwezigheid van een in het vaatlumen ingebracht deel van de vaatwand. In dit experimentele model is de voor plaatjesaggregatie noodzakelijke factor aanwezig, namelijk de flap als sterk thrombogene subendotheliale structuur (collageen-media-adventitia). Onder invloed van de stenose c.q. de flap is er sprake van een toeneming van de bloedstroomsnelheid, waardoor relatief meer plaatjes zowel met elkaar als met de vaatwand ter plaatse van de stenose in contact komen.

In dit experimentele model zijn derhalve zowel het aanloop- als aflooptraject van de stenose plaatsen waar plaatjesneerslag en thrombusvorming zal plaatsvinden, ook indien de afneming in lumendiameter c.q. lumenoppervlak (in tegenstelling tot bij een haemodynamisch kritische stenose) onvoldoende groot is om een vermindering van de bloedstroomsnelheid te veroorzaken.

HOOFDSTUK 3 - HET EFFECT VAN FARMACA OP DE THROMBUS

3.1 - INLEIDING

In het algemeen kunnen de middelen, die thrombose beïnvloeden, ingedeeld worden in drie groepen:

1. middelen, die de plaatjesactiviteit beïnvloeden:
 - a. plaatjesadhaesieremmende middelen
 - b. plaatjesaggregatieremmende middelen, zoals:
 - cyclooxygenaseremmers
(zoals acetylsalicylaat, sulfinpyrazon, indobufen)
 - thromboxaan receptor-antagonisten
(zoals het sulfonamide-derivaat BM-13.177)
 - thromboxaansynthetaseremmers
(zoals imidazol, dazoxiben)
 - cyclisch AMP-concentratie verhogende middelen door:
 - . adenylylcyclasestimulatie
(zoals prostacycline, PGE₁, adenosine)
 - . remming van fosfodiësterase
(zoals dipyramidol, methylxantines)
 - middelen, die de fibrinogeenbinding aan geactiveerde plaatjes remmen (zoals mogelijk ticlopidine)
2. thrombineformatieremmende middelen (anticoagulantia)
3. middelen, die het fibrine tot oplossing brengen (zoals streptokinase en weefseltype-plasminogeenactivator)

3.2 - KEUZE VAN DE FARMACA VOOR THROMBUSREMMING

Voor het onderzoek in het aortaflapmodel werden farmaca gekozen uit de drie bovengenoemde groepen.

- Uit groep 1 werd gekozen voor acetylsalicylaat (ASA) en ticlopidine, die elk een verschillend aangrijpingspunt in de aggregatieremming hebben.

Voor ASA berust deze keuze voorts op de reeds aanwezige ervaring in experimentele en klinische studies alsmede de eenvoud van toediening zonder de noodzaak tot bloedcontrole.

- Uit groep 2 werd gekozen voor warfarine vanwege het veelvuldige klinische gebruik in de preventie en de behandeling van thrombose; tevens is het middel geschikt voor behandeling op lange termijn.
- Op basis van recente gunstige resultaten bij het oplossen van thrombi in met name coronairarteriën en het uitblijven van systeemeffecten (bijvoorbeeld defibrinatie), werd uit groep 3 gekozen voor een weefseltype-plasminogeenactivator, t-PA.

3.3 - ACETYLSALICYLAAT

Inleiding

Het therapeutische succes van ASA als een effectief analgeticum, anti-pyreticum en ontstekingsremmend middel was reeds lang bekend voordat het plaatjesaggregatieremmende werkingsmechanisme in 1971 door Vane werd beschreven. Bij mens en dier bestaat dit fundamentele mechanisme uit remming van de productie van prostaglandinen.

In de opeenvolging van reacties, via welke prostaglandinen uit arachidonzuur worden gevormd, remt ASA het cyclooxygenase door een acetyleringsreactie op irreversibele wijze. Door inactivering van het cyclooxygenase in bloedplaatjes wordt het aggregatiebevorderende thromboxaan niet meer gevormd (Roth et al. - 1975). De acetylering kan via synthese van nieuw cyclooxygenase in alle weefsels (bijvoorbeeld endotheelcellen) worden gecorrigeerd, behoudens in bloedplaatjes waarin geen eiwitsynthese plaatsvindt.

Experimenteel overzicht

In de verwachting plaatjesaggregatie en derhalve arteriële thrombose met ASA te remmen, werden vele experimentele en klinische studies opgezet (Philp - 1981). Omdat de plaatjethrombi door incorporatie in de vaatwand aanleiding kunnen geven tot groei van plaques, zou als extra effect de atherogenese kunnen worden geremd (Mustard - 1978, Mitchell - 1982).

In de vaatwand vindt, evenals in de bloedplaatjes, synthese plaats van prostaglandinen, echter niet van thromboxaan maar overwegend van pros-

tacycline, dat een sterk aggregatieremmende werking heeft (Moncada et al. - 1976).

Prostacycline is één van de meest krachtige, tot nu toe geïdentificeerde plaatjesaggregatieremmers. Remming van de prostacyclinesynthese vindt plaats bij een hogere concentratie ASA dan die, welke de thromboxaan-synthese vermindert.

Een en ander leidde tot de overweging, dat hoge doseringen ASA de anti-thrombotische effecten van prostacycline door syntheseblokkering teniet kunnen doen (Kelton - 1978, O'Grady en Moncada - 1978). Omdat ASA de vorming van twee biologisch elkaar tegenwerkende stoffen remt, kon van een "Apirine-dilemma" worden gesproken en stelde Marcus (1977), gezien dit tweeledige effect van ASA, het klinisch gebruik ervan ter discussie.

De doseringsschema's zouden zodanig gekozen moeten worden, dat enerzijds de synthese van de pro-aggregatoire plaatjesprostoglandinen en het thromboxaan zou worden geremd en anderzijds de synthese van het anti-aggregatoire endotheliale prostacycline intact zou worden gelaten.

Villa et al. (1979) toonden in de rat aan, dat de 50%-remmende dosis van ASA op de prostacyclineproductie in endotheel van arteriën hoger is dan van venen (respectievelijk 25.0 en 2.3 mg/kg/i.p.). De 50%-remmende dosis van ASA op de malondialdehydeproductie door plaatjes als maat voor de thromboxaanvorming bedroeg 3.6 mg/kg/i.p. ASA 10 mg/kg/i.p. was de laagste dosis waarmee maximale remming op de malondialdehydeproductie door plaatjes werd verkregen. Tevens werd een remming van veneus en arteriëel prostacycline geconstateerd. Bij een dosis van 50 mg/kg/i.p. werden zowel de malondialdehydeproductie door plaatjes als de prostacyclinesynthese door de vaatwand voor meer dan 95% geremd. Ook bleek het herstel van de plaatjesactiviteit bij deze hoge dosis veel langer te duren dan bij de lagere dosis, hetgeen mogelijk verklaard kan worden door inactivatie van het enzym in de megakaryocyt.

Door diverse auteurs werden aan de hand van verschillende thrombose-modellen meerdere ASA-doseringen getest. Hierbij bleek, dat een verlaging van de dosering (van 100-200 mg/kg naar 3-10 mg/kg) een effectie-

vere remming op de plaatjesaggregatie teweegbracht (Buchanan et al. - 1980: stasemodel in de a. carotis van het konijn, Wu et al. - 1981: deëndoethelialisatie van de aorta in het konijn, Paris et al. - 1983: extracorporele shunt tussen de rechter a. carotis en de linker v. jugularis in de rat, Philp et al. - 1983/1984: elektrisch geïnduceerde thrombose in de a. carotis in de rat).

Uit observaties van weefselkweken (Jaffe et al. - 1979), dierexperimenteel onderzoek (Villa et al. - 1979) en humane studies (Preston et al. - 1981) is gebleken, dat een volledige dissociatie van het effect van ASA op de plaatjes en het endotheel niet mogelijk is, en dat het "Aspirine-dilemma" op basis van de dosering alléén niet opgelost kan worden (Davi - 1983, De Gaetano - 1985).

Wat betreft de duur van het effect van ASA, is het herstel van de thromboxaanproductie afhankelijk van de aanwezigheid van nieuwe plaatjes met niet-geacetyleerd cyclooxygenase. Cerskus et al. (1980) stelden, dat een niveau van 10% normaal functionerende plaatjes voldoende is voor normale plaatjesaggregatie. Aangezien dagelijks ongeveer 10% van de plaatjes wordt ververs, lijkt een éénmalige dagdosis ASA voldoende voor het verkrijgen van antithrombotische activiteit.

Bovenstaande in aanmerking nemende en gezien het feit, dat de prostacyclineproductie zich snel herstelt (bij mens en rat binnen 24 uur na een éénmalige dosis), is het doseringsinterval wellicht even belangrijk als de dosis zelf (Masotti - 1979, Villa - 1979).

Jaffe et al. (1979) toonden in een in vitro studie aan, dat het veneuze endotheel direct na verwijdering van ASA uit een celcultuur in staat is om een kleine hoeveelheid prostacycline te vormen, terwijl de synthese na circa 36 uur weer genormaliseerd is.

Tot vergelijkbare conclusies kwam Livio (1978) in een in vivo studie bij de rat, waarin de prostacycline- en malondialdehydeproductie werden gemeten nadat éénmalig ASA was toegediend (200 mg/kg/i.p.). Een éénmalige dagelijkse dosis is mogelijk toereikend om de prostacyclineproductie te waarborgen en het percentage geremde plaatjes steeds boven de 90 te houden.

Verschillende auteurs (Burch - 1978, Masotti et al. - 1979, Patrono et al. - 1980, Hanley et al. - 1981/1982, Patrignani et al. - 1982, Fitzgerald - 1983) vonden een volledige remming van de thromboxaanproductie gedurende minimaal 48 uur na een enkele orale dosis ASA (variërend van 20 tot 400 mg). Op basis van de duur van dit effect en de overeenkomstige afnemng van de thromboxaanconcentratie, stelde Kern (1981), dat een orale dagdosis van meer dan 150 mg ASA te hoog zou zijn.

Bij een orale dagdosis van 40 mg ASA vonden Hoogendijk et al. (1980) in venen een cumulatief effect op de thromboxaansynthese, met een maximale remming (95%) op de tiende dag. Dit effect werd bevestigd door Weksler et al. (1985) bij patiënten, die in aanmerking kwamen voor een coronaire overbruggingsplastiek. Vanaf één week prae-operatief werd dagelijks 20 mg ASA oraal gegeven en de mate van remming op de arteriële en veneuze prostacyclineproductie vastgesteld; deze kwam overeen met het effect van één enkele prae-operatieve orale dosis van 80 mg ASA.

Toediening van extreem laag gedoseerd ASA (1 mg/dag/p.o.) gedurende langere tijd (langer dan 6-8 weken) verhoogt de plaatjesgevoeligheid voor de aggregatieremmende werking van prostacycline. Dit wordt geïllustreerd door een afnemng van de prostacyclineconcentratie, die noodzakelijk is voor remming van de ADP-geïnduceerde aggregatie (Sinzinger et al. - 1984).

Deze verandering in plaatjesgevoeligheid kan een belangrijk effect van ASA zijn en zou, naast het differentiële effect van ASA op de prostacycline- en thromboxaanproductie, kunnen leiden tot een optimale ASA-dosering variërend van 1 tot 30 mg per dag.

Biochemische selectiviteit van ASA op respectievelijk de thromboxaan- en prostacyclinesynthese kan noch in vitro (Jaffe en Weksler - 1979) noch na intraveneuze toediening (Cerletti - 1986) worden verkregen, maar zou farmacokinetisch verklaard kunnen worden door de farmacologische beschikbaarheid van ASA in de portale en systemische circulatie.

De bloedplaatjes komen in de gastro-intestinale capillairen snel in aanraking met het toegediende ASA, waarna hun aggregatieneiging irreversibel wordt geblokkeerd, terwijl als gevolg van deacetylering in darm en lever,

lagere concentraties de systemische circulatie bereiken en aldus een gering effect op het endotheel uitoefenen. Bij intraveneuze toediening van ASA worden zowel de thromboxaan- als de prostacyclineproductie in gelijke mate geremd (Cerletti et al. - 1986).

Na éénmalige orale toediening van een lage dosis ASA is de concentratie van thromboxaan B₂ (afgeleid van thromboxaan A₂), gemeten in perifere bloed, al na vijf minuten gereduceerd door portale (praesystemische) inactivatie, terwijl ASA perifeer niet meetbaar is door deacetylering in de lever ("first pass deacetylation", Pedersen et al. - 1984/1985). Daarnaast blijkt een cumulatieve remming van de thromboxaansynthese te bestaan (Patrono - 1985, Rosenkranz - 1985, Roberts et al. - 1986, Kallman et al. - 1987).

Als alternatief voor oraal toegediend ASA (40 mg/dag) geeft "enteric coated" ASA in een hogere dosering (80 mg/dag) zonder bijwerkingen (maagslijmvliesirritatie) na 4 dagen een reductie van 90% van het plaatjes-cyclooxygenase (Eastham - 1985, Jakubowski et al. - 1985).

Bij de mens is een differentiëel effect van éénmalig oraal toegediend ASA (40 mg) op de prostacyclinesynthese in veneus weefsel vastgesteld, afkomstig van respectievelijk de v. saphena magna (niet geremd) en v. mesenterica (wel geremd), terwijl na intraveneuze toediening remming van de prostacyclinesynthese in beide vaten wordt gezien (De Gaetano et al. - 1986).

Gezien de remming van zowel de thromboxaan- als de prostacyclinesynthese na intraveneuze toediening bij de rat, kan geconcludeerd worden dat ASA géén selectieve plaatjesremmer is en dat het cyclooxygenase in zowel plaatjes als endotheel even gevoelig is. Dit ondersteunt de bevindingen van Jaffe et al. (1979) betreffende de in vitro remming van plaatjes en endotheelcellen door ASA.

Oraal toegediend ASA bereikt, na snelle hydrolyse in de portale circulatie en de lever, de systemische circulatie als salicylaat (Rowland - 1972, Pedersen et al. - 1984, Cerletti et al. - 1985, De Gaetano et al. - 1985). Het salicylaat zelf heeft geen remmend effect op het cyclooxygenase, maar

het voorkomt de activiteit van ASA door een dosisafhankelijke (mogelijk competitieve) remming, de zogenaamde "Aspirine-Aspirine interactie" (Castellarneau et al. - 1981, De Gaetano - 1985). In mens en rat is de interactie tussen salicylaat en ASA niet beperkt tot het plaatjesenzym, maar geldt ook, en nog sterker, voor het vaatwandcyclooxygenase (Dejana - 1985, Telias et al. - 1985).

Dit beschermend effect van salicylaat op de prostacyclineproductie is dosisafhankelijk (Dejana et al. - 1981) en versterkt de reeds verhoogde respons van plaatjes onder invloed van oraal toegediend ASA. Hoewel het mechanisme onbekend is, waarmee salicylaat het effect van ASA op plaatjes en endotheel beïnvloedt, is het beschermend effect mogelijk van belang bij de interpretatie van de resultaten verkregen met hoge doseringen en/of herhaalde toediening van ASA.

Klinisch overzicht

De rol van plaatjes bij thrombose heeft geleid tot veel studies naar het effect van plaatjesremmende middelen bij cardiovasculaire ziekten.

In de literatuur zijn overzichten gegeven door Mustard et al. (1973), Genton (1975), Fuster et al. (1981), Meade (1981), Wessler et al. (1981), Weksler (1982), Jacobs et al. (1983), De Gaetano (1986), Gallus (1986) en Harker (1986).

Na het myocardinfarct en de cerebrale thrombo-embolie (CVA, TIA, amaurosis fugax) alsmede in de secundaire preventie bij perifere arteriosclerose (claudicatio intermittens) wordt ASA preventief toegepast. Hoewel de invloed van plaatjesremmende middelen bekend is, is echter sprake van een controverse over de juiste dosering. Hieronder wordt een overzicht gegeven van de grote, dubbelblind gerandomiseerde studies bij de bovengenoemde ziektebeelden. Voor een overzicht van het effect na vaatreconstructies wordt verwezen naar hoofdstuk 4.2.

Ischaemische hartziekten

De secundaire preventie van het myocardinfarct heeft tot doel de mortaliteit en de complicaties ten gevolge van het initiële moment te reduceren en recidivering te voorkomen, terwijl de primaire preventie erop is gericht

om bij patiënten met een hoog risico een eerste accident te voorkomen. Zeer recent zijn de voorlopige resultaten van Amerikaanse "Physicians' Health Study" (1988) en het Engelse onderzoek van Peto et al. (1988). In het Amerikaanse dubbelblind prospectieve onderzoek werden 22071 mannelijke artsen gerandomiseerd in een ASA-groep (325 mg, om de dag) en een placebogroep. Na een gemiddelde follow-up van 4.8 jaar, werden in de ASA-groep 47% minder myocardinfarcten vastgesteld dan in de placebogroep, terwijl in de ASA-groep een geringe verhoging van het aantal CVA's (15%; niet significant) optrad. De totale sterfte was zeer laag (minder dan 1%) en liet geen verschil zien tussen de ASA- en de placebogroep.

In het Engelse gerandomiseerde, open-prospectieve onderzoek werd een groep mannelijke artsen (n=5139) verdeeld in een ASA-groep (n=3429) en een niet-behandelde groep (n=1710). In de behandelde groep werd een niet-significante vermindering geconstateerd van het aantal myocardinfarcten (2% van de niet-fatale en 5% van de fatale infarcten). In de ASA-groep bleek de frequentie van TIA's vrijwel gehalveerd (van 27.5 tot 15.9%), terwijl (analoog aan het Amerikaanse onderzoek) een niet-significante toeneming van het aantal CVA's werd gezien.

De voor het myocardinfarct gevonden verschillen tussen beide studies kunnen aan een aantal factoren worden toegeschreven: In tegenstelling tot het Amerikaanse onderzoek, was het Engelse onderzoek een open onderzoek. Daarnaast was de controlegroep in het Engelse onderzoek veel kleiner en verschilde de gemiddelde dagdosis ASA (in het Amerikaanse onderzoek 162.5 mg en in het Engelse onderzoek 500 mg). Opvallend was, dat de totale sterfte in het Engelse onderzoek duidelijk hoger was (8% versus 1%).

Het natuurlijk beloop van een myocardinfarct beïnvloedt de opzet en de interpretatie van klinisch onderzoek naar de secundaire preventie van het myocardinfarct. De mortaliteit gedurende de eerste maand bedraagt ongeveer 40%, waarna in het eerste jaar nog eens ongeveer 10% overlijdt. Het reïnfarceringspercentage en de mortaliteit stabiliseren zich vervolgens op ongeveer 3 tot 5% per jaar (Harker - 1986). Afhankelijk van cardiale factoren (zoals onder meer cardiale dysfunctie, ventrikulaire aritmie en

TABEL 1

PROSPECTIEVE, GERANDOMISEERDE, DUBBELBLINDE ONDERZOEKEN NAAR HET GEBRUIK VAN AGGREGATIEREMMENDE
MIDDELEN NA HET MYOCARDINFARCT (MI)

onderzoek	aantal pat.	sexe	latentie- tijd	gemid. follow-up	middel	dosis mg/dag	eindpunten	resultaat
Elwood et al. (1974)	1239	m	6 mnd	12 mnd	ASA	300	totale mortaliteit	pos.trend/n.s.
Coronary Drug Project (1976)	1529	m	jaren	22 mnd	ASA	972	totale mortaliteit coron.art.disease MI + CVA	pos.trend/n.s.
Breddin et al. (1977)	946	80% m 20% v	4-6 wkn	24 mnd	ASA	1500	plotselinge dood MI	pos.trend/n.s.
Elwood et al. (1979)	1682	85% m 15% v	dgn-wkn	12 mnd	ASA	900	totale mortaliteit	pos.trend/n.s.
AMIS (1980)	4524	89% m 11% v	2-60 mnd	38 mnd	ASA	1000	totaal, fataal en niet-fataal MI/CVA	geen voordeel
PARIS I (1980)	2026	87% m 13% v	2-60 mnd	44 mnd	ASA ASA+Dipyrr.	972 972+225	totaal, fataal en niet-fataal MI	pos.trend/n.s.
PARIS II (1986)	3128	83% m 17% v	1-4 mnd	24 mnd	ASA+Dipyrr.	990+225	idem	significant t.a.v. niet-fataal MI

voorwandreïnfarcering), kan de mortaliteit na de eerste maand in het eerste jaar oplopen tot 20%.

Het is echter duidelijk, dat de hierna te noemen studies naar de secundaire preventie van het myocardinfarct een vertekend beeld geven omdat een selectie heeft plaatsgevonden van patiënten, die langer dan enkele maanden tevoren een infarct hebben doorgemaakt, zodat de "high risk" patiënten niet in deze onderzoeken opgenomen zijn. In de secundaire preventie kan de antithrombotische behandeling worden onderverdeeld in therapie met aggregatieremmers, anticoagulantia en thrombolytica (Meade - 1980). Aangezien aan de plaatjes een primaire rol wordt toegeschreven in het ontstaan van arteriële thrombose en de groei van atherosclerotische plaques (Duguid - 1949), ligt behandeling met aggregatieremmers voor de hand. Plaatjesaggregatie en thrombusvorming op een reeds aanwezige plaque kunnen, mogelijk ten gevolge van het vrijkomen van plaatjesfactoren en het optreden van coronairarteriespasmen (Maseri - 1978), leiden tot een myocardinfarct en plotselinge dood (Chandler et al. - 1974, Ridolfi - 1977, DeWood et al. - 1980, Falk - 1983/1985). Arteriografie, uitgevoerd binnen 24 uur na een myocardinfarct, vertoont bij ongeveer 90% van de patiënten een volledige coronairocclusie op basis van thrombose-ring op een atherosclerotische plaque (DeWood et al. - 1980)

De zeven grote, klinisch gerandomiseerde, dubbelblind onderzoekingen over het gebruik van ASA (soms gecombineerd met dipyramidol of sulphinpyrazon) in de secundaire preventie van het myocardinfarct, zijn schematisch weergegeven in tabel 1.

Behoudens in de PARIS II-studie, kon ASA in deze studies in een dosering van 300 tot 1500 mg geen significante verlaging van de mortaliteit bewerkstelligen; wel bleek een gunstige trend aanwezig te zijn.

Naar aanleiding van de conclusie van de PARIS I-studie, werd de PARIS II-studie gestart, waarin de behandeling van patienten sneller na het infarct werd aangevangen met driemaal daags 330 mg ASA en 75 mg dipyramidol. Het doel was om bij patiënten van 30 tot 74 jaar binnen 4 weken tot 4 maanden na een myocardinfarct, het effect te bestuderen van een combinatie van ASA en dipyramidol versus een placebo. De gestelde eindpunten waren: de totale mortaliteit, de coronaire mortaliteit, het coro-

naire recidief na een jaar en beeïndiging van de studie na 2 jaar. Na het afsluiten van de studie, bedroeg het verschil in coronaire incidentie (niet-fataal en fataal myocardinfarct) tussen de ASA/dipyramidol-groep en de placebogroep 24% ten voordele van de eerste groep. In de behandelde groep was de coronaire mortaliteit 6% lager en de totale mortaliteit 3% lager. Halverwege de studie bedroegen deze verschilpercentages respectievelijk 30, 20 en 11. Het verschil in coronaire incidentie werd voornamelijk bepaald door het gunstige effect op de niet-fatale myocardinfarcten, terwijl de coronaire en totale mortaliteit nauwelijks werden beïnvloed.

Op de studies van vóór 1980 was veel kritiek (Fuster et al. - 1981, Lubsen - 1981). De prognose op korte termijn wordt na een infarct eerder bepaald door myocardiale factoren dan door thrombose en/of coronaire anatomie. Het is aannemelijk, dat andere mechanismen dan thrombotische herafsluiting een rol spelen bij het optreden van een recidief of de dood; de ervaringen met onder meer betablokkers na een infarct lijken dit te bevestigen (Verheugt - 1984, Gallus - 1986)). De overleving bij coronair-ziekten wordt eveneens beïnvloed door de mate van linker ventrikeldysfunctie, die in de genoemde studies echter niet gemeten werd (Mitchell - 1981). In deze studies werd de behandeling pas geruime tijd na het infarct aangevangen. De trials waren kort van duur (gemiddeld van 12 tot 44 maanden), maar in het licht van het natuurlijk beloop van de ziekte lijkt het zinvol deze duur te verlengen. De zeven studies hadden mortaliteit of reïnfarcering als einddoel, terwijl de progressie van het thrombo-atherosclerotische proces onder invloed van de medicatie helaas niet gemeten kon worden.

Aangezien sinds het begin van de zeventiger jaren een daling is ingetreden van de mortaliteit, lijkt het in de toekomstige studies naar het effect van plaatjesremmende middelen op lange termijn zinvol om de incidentie van cardiovasculaire en ischaemische cerebrale ziekten alsmede perifeer arteriosclerotische ziekten vast te stellen. Deze daling is wellicht zowel een gevolg van betere behandelingsmogelijkheden als van een werkelijke daling van acute ischaemische aandoeningen (Philp - 1981, Dunning - 1985, Hoogendoorn - 1985).

De relatieve ineffectiviteit van ASA in de secundaire preventie van het myocardinfarct werd door Born et al. (1983) verklaard door de plotseling optredende anatomische en biochemische veranderingen in het coronairvat. Het "at random" ontstaan van fissuren en fractures in atheromateuze plaques leidt tot plaatselijke bloedingen en het vrijkomen van ADP uit beschadigde intimacellen (Ridolfi - 1977, Falk - 1983). Naast de "release reactie" met thromboxaanproductie, zijn plaatjes derhalve blootgesteld aan meerdere stimuli, die aanleiding kunnen geven tot snelle aggregatie. In dit kader worden tenslotte ook de hoge bloedstroomsnelheid en de "shear rate" ter plaatse van een atherosclerotische vernauwing van belang geacht.

Het is interessant om de resultaten bij patiënten met een myocardinfarct te vergelijken met die bij een groep patiënten zonder een infarct in de anamnese. Door Lewis et al. (1983) werden de resultaten gepubliceerd van een dubbelblind gerandomiseerd onderzoek bij 1276 patiënten met instabiele angina pectoris, behandeld met ASA 324 mg/dag of een placebo. Bij de patiënten die gedurende drie maanden na hun initiële klachten ASA gebruikt hadden, werd het risico van een niet-fataal myocardinfarct gehalveerd (van 6.9 naar 3.4%) en trad tevens een halvering van de mortaliteit op (van 3.3 naar 1.6%). Cairns et al. (1985) kwamen tot overeenkomstige conclusies bij 555 patiënten, die gedurende gemiddeld 19 maanden met ASA 3x325 mg/dag werden behandeld vanaf de achtste dag na het stellen van de diagnose. Er trad een vermindering op van zowel fatale als niet-fatale myocardinfarcten (tezamen van 13 naar 6%).

Concluderend kan gesteld worden, dat:

- een lage dosis ASA bij gezonde mannen de kans op een myocardinfarct in de primaire preventie doet afnemen
- de kans op een myocardinfarct bij patiënten met angina pectoris afneemt onder invloed van ASA
- langdurige behandeling met ASA (in combinatie met dipyridol) na een myocardinfarct alleen gerechtvaardigd is op basis van de PARIS II-studie
- de relatieve veiligheid, de lage kosten en de algemene beschikbaarheid van ASA aantrekkelijke factoren zijn

TABEL 2

ONDERZOEKEN NAAR DE SECUNDAIRE PREVENTIE VAN CVA'S EN TIA'S

onderzoek	diagnose	aantal pat.	latentie-tijd	gemid. follow-up	middel	dosis mg/dag	eindpunten	resultaat
Fields et al. AITA I (1977)	TIA	178	mnd-jr	6 mnd	ASA	1300	tot.mort.+CVA-mort. cerebr./retina-inf. TIA-frequentie	n.s. n.s. sign.
Fields et al. AITA II (1978)	TIA	125	mnd-jr	6 mnd	ASA	1300	idem	n.s.
Can. Coop. Study Group (1978)	TIA/RIND	585	< 3 mnd	26 mnd	ASA Sulf.pyr. ASA+sulf.pyr.	1300 800	tot.mort. niet-fataal CVA recid.TIA's	sign. sign. sign.
Reuther et al. (1978)	TIA/RIND	60	3 mnd	24 mnd	ASA	1500	CVA+TIA	sign.
Bousser (1983)	TIA/CVA	604	< 1 jr	36 mnd	ASA ASA+Dipyrr.	990 990+225	fat./niet-fataal CVA	sign.
Sorensen (1983)	TIA/RIND	203	< 1 mnd	25 mnd	ASA	1000	CVA+TIA's+tot.mort.	n.s.
Am. Can. Coop. Study Group (1985)	TIA	890	mnd	25 mnd	ASA ASA+Dipyrr. geen placebo	1300 1300+300	CVA+TIA's +mortaliteit	n.s.
UK TIA Study (1988)	TIA	2435	geen	4 jr	ASA ASA	300 1200	niet-fataal CVA +vasc.mortaliteit	n.s.

Cerebrovasculaire ziekten

CVA's en TIA's

Het doel van de behandeling van patiënten met symptomen van cerebrale ischaemie is tweeledig: de preventie van TIA's en het voorkomen van progressie naar een volledig CVA. Dit laatste komt voor bij 10 tot 15% van de patiënten met TIA's of RIND's (reversible ischemic neurological deficit) na 1 jaar en bij 25 tot 40% binnen 5 jaar. Aangezien deze patiënten een hoog risico (40 tot 50% van de mortaliteit treedt op gedurende de follow-up) lopen om een fataal myocardinfarct te krijgen, wordt in tweede instantie gestreefd naar een reductie van de totale cardiovasculaire morbiditeit en mortaliteit (Whisnant - 1978, Gallus - 1986, Harker - 1986). Onder invloed van ASA in doseringen van 600 tot 2400 mg/dag werden casuïstische successen gemeld bij patiënten met TIA's en amaurosis fugax door onder andere Harrison (1971), Mundall (1971) en Dijken (1979).

Er zijn acht prospectieve, gerandomiseerde studies met ASA bekend naar de secundaire preventie van CVA's en TIA's (zie tabel 2).

In de meest recente studie bij patiënten met TIA's, U.K. TIA Study, wordt het effect van verschillende ASA-doseringen vergeleken. In dit onderzoek werden 3000 patiënten met TIA's gerandomiseerd voor een placebo, 300 mg en 1200 mg ASA/dag. Het interim-rapport (1988) over deze studie betreft 2435 patiënten met een gemiddelde follow-up van 4 jaar en laat in de behandelde groepen een dosisonafhankelijke daling van 18% zien in het voorkomen van niet-fatale myocardinfarcten en CVA's alsmede vasculaire en niet-vasculaire mortaliteit. Het voorkomen van invaliderende CVA's en vasculaire mortaliteit was daarentegen slechts 7% lager dan in de placebogroep (niet significant).

In de meta-analyse van de vijf ASA-trials tezamen, werd in de ASA-groepen opzichte van de placebogroep een -overigens niet significante- afneming in de CVA-frequentie gezien (Sze et al. - 1988). Alleen de resultaten van de Canadian Cooperative Study Group (1978) en het onderzoek van Bousser (1983) kwamen overeen in de respons op ASA in een dosering van 1 tot 1.5 gram per dag. Er bestond een afneming van het aantal TIA's en bovendien een afneming van de mortaliteit ten gevolge van het CVA en het myocardinfarct; toevoeging van sulphinpyrazon of dipyramidol

aan de ASA-dosis leverde geen voordeel op.

In tegenstelling tot de Canadese trial (1978), werd in de overige studies geen sexe-verschil gevonden. Het percentage behandelde vrouwen in de verschillende trials bedraagt gemiddeld ongeveer 30%; in de Canadese en Amerikaanse trials blijken vrouwen in de placebogroepen een betere prognose te hebben dan mannen. Een nuttig effect van ASA bij vrouwen kan hierdoor gemist zijn, waarmee de vraag onbeantwoord blijft in hoeverre de antithrombotische activiteit sexe-afhankelijk is.

De secundaire preventie bij perifere arteriosclerose, i.h.b. bij claudicatio intermittens

De kennis omtrent het natuurlijk beloop van claudicatio intermittens is incompleet omdat vele van deze patiënten nooit door een vaatchirurg worden gezien en gegevens derhalve ontbreken. Daarnaast worden de symptomen in prevalentiestudies (door het gebruik van vragenformulieren) vaak overschat, waardoor veel vals positieven voorkomen. Ook kan de mate van lichamelijke activiteit in de verschillende populaties een rol spelen in het klachtenpatroon.

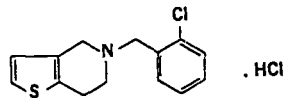
De incidentie van claudicatio bij mannen ouder dan 50 jaar wordt geschat op ongeveer 5%; in ongeveer 75% van de gevallen verloopt dit ziektebeeld min of meer goedaardig en brengt geen ernstige klachten teweeg, terwijl ongeveer 5% ooit een amputatie zal ondergaan. Op basis van een gegeneraliseerd lijden, is de levensverwachting van deze groep patiënten daarentegen lager, waarbij ongeveer 75% van de totale mortaliteit veroorzaakt wordt door atherosclerose (10% abdominaal, 15% cerebraal en 50% coronair). Secundaire preventie kan derhalve een tweeledig effect hebben: enerzijds afnemng van de claudicatio intermittens en anderzijds beïnvloeding van de vaak levensbedreigende pathologie (Dormandy et al. - 1986).

De eerste prospectieve studie naar het effect van ASA op de progressie van atherosclerose in de benen werd gepubliceerd door Schoop et al. (1983). Uit deze studie bleek onder invloed van ASA, dat een vertraging optrad in de progressie en dat het occlusiepercentage van de a. femoralis superficialis in 4.5 jaar daalde van 58 naar 20.

De tweede prospectieve, arteriografische, dubbelblind-studie naar de invloed van plaatjesremmende middelen op perifere occlusieve arteriopathie werd verricht door Hess et al. (1985). Zij randomiseerden 240 patiënten in drie groepen, die gedurende twee jaar respectievelijk behandeld werden met ASA (3x330 mg), al dan niet gecombineerd met dipyramidol (3x75 mg), dan wel met een placebo. Arteriografie vond zowel initiëel en als na twee jaar plaats of eerder wanneer verslechtering werd vastgesteld. Progressie van de ziekte was het meest uitgesproken in de placebogroep en was minder duidelijk aanwezig in de ASA-groep, terwijl de combinatie ASA en dipyramidol het meest effectief was. Tevens bleek in de actief behandelde groepen een trend te bestaan tot afnemning van de stenose-ring.

3.4 - TICLOPIDINE

Ticlopidine is een plaatjesaggregatieremmende verbinding met een geheel ander werkingsmechanisme dan ASA. Maximale remming van plaatjesfuncties wordt gevonden na orale toediening van ticlopidine, zodat vermoedelijk niet de verbinding zelf (zie figuur 4), maar een nog onbekende metaboliet de plaatjesremming veroorzaakt.



Figuur 4 - De structuurformule van ticlopidine.

Oraal toegediend ticlopidine verlengt de bloedingstijd en vertraagt de onder bepaalde omstandigheden (bijvoorbeeld tijdens extracorporele circulatie) versnelde plaatjesafbraak. Voor zover bekend, heeft ticlopidine geen effect op stolling en fibrinolyse (Ashida et al. - 1979, Installe - 1981, Violi et al. - 1982, Aukland - 1982), behalve mogelijk een verlaging van de *fibrinogeenspiegel op lange termijn* (Conrad - 1980). *In vitro* remt ticlopidine de plaatjesaggregatie pas bij zeer hoge (bij normale dosering niet bereikte) plasmaconcentraties (Panak et al. - 1983, De Gaetano et al. - 1984). Een opvallend verschil met andere aggregatieremmers is, dat

ticlopidine ook de primaire, door ADP-geïnduceerde aggregatie remt (O'Brien et al. - 1978). Een soortgelijke abnormale ADP-geïnduceerde aggregatie wordt alleen gevonden bij patiënten met de ziekte van Glanzmann (Glanzmann's thrombasthenie), bij wie het glycoproteïne IIb-IIIa-complex in het plaatjesmembraan ontbreekt. Activering van dit complex (via ADP en calciumionen) leidt in plaatjes normaliter tot binding van onder meer fibrinogeen en de Von Willebrand factor en veroorzaakt irreversibele aggregatie; bij Glanzmann-patiënten treedt echter geen binding aan dit complex op. Eenzelfde verschijnsel werd na stimulatie gevonden bij plaatjes van met ticlopidine behandelde personen, namelijk een verminderde binding van fibrinogeen en de Von Willebrand factor (Lee et al. - 1981, Dunn et al. - 1983, Minno et al. - 1985).

Het effect van ticlopidine op de plaatjesaggregatie is dus vermoedelijk toe te schrijven aan de inductie van een functionele deficiëntie van het glycoproteïne IIb-IIIa-complex door een metaboliet van ticlopidine (Minno et al. - 1985). Eenzelfde deficiëntie in fibrinogeenbinding als beschreven bij humane bloedplaatjes is ook aangetoond bij plaatjes van met ticlopidine behandelde ratten (Minno et al. - 1982).

Gezien het bovenstaande zal ticlopidine een dosisafhankelijke remming van de plaatjesaggregatie teweegbrengen, zonder het endotheel van de vaatwand of de stolling te beïnvloeden. Onderzocht is, in hoeverre thrombusremming optrad in het aortaflapmodel, waarin juist de combinatie van plaatjes, vaatwand en stollingfactoren alsmede het effect van de flap op de bloedstroom een belangrijke rol spelen.

Experimenteel overzicht

Ticlopidine remt de thrombusvorming in een groot aantal experimentele modellen. Vigdahl et al. (1979) beschreven thrombusremming door een zeer hoge dosis ticlopidine (300 mg/kg/p.o.) in een electrisch en door bevriezing gestimuleerd thrombosemodel in de a. carotis van de rat. Ashida et al. (1980) brachten een laesie aan in de a. femoralis van de rat door inspuiting van natriumlaureaat en vonden thrombusremming door ticlopidine in dosering van 30 en 100 mg/kg/p.o. In tegenstelling tot een combinatie van ASA en dipyramidol, bleek ticlopidine gangreen te voorkomen.

In een microthrombotisch lasermodel bij de rat bleek thrombusvorming in mesenteriaalarteriën te worden verminderd door een enkele dosis ticlopidine 100 of 200 mg/kg/p.o.; doseringen van minder dan 100 mg/kg/p.o. lieten echter geen remmend effect zien (Weichert et al. - 1983). Pumphrey et al. (1982) beschreven onder invloed van ticlopidine (30 mg/kg/dag/p.o.) remming van de plaatjesdepositie in zowel veneuze autotransplantaten als PTFE-allotransplantaten in een arteriëel stasemodel bij de hond. Tegenover deze positieve bevindingen staan de resultaten van Cattaneo et al. (1985): Bij de rat en het konijn bleek ticlopidine (100 tot 400 mg/kg/dag/p.o.) de thrombusvorming op een langdurig in de aorta aanwezige catheter of op de met een balloncatheter beschadigde aorta niet te verminderen. Omdat heparinisatie in dezelfde proefopstelling wél werkzaam was, werd als oorzaak van deze ineffectiviteit de voornamelijk door thrombine geïnduceerde thrombusvorming verondersteld. In dit model bleek, dat ticlopidine wel de plaatjesoverleving normaliseerde, maar geen effect had op de thrombusvorming.

In de perfusiekamer van Baumgartner bestudeerden Escolar et al. (1987) het effect van ticlopidine op de plaatjesadhaesie en thrombusvorming in humaan bloed bij een "shear rate" van 800 sec^{-1} . Ticlopidine (500 mg/dag/p.o.) veroorzaakte een significante afneming van de thrombusmassa, terwijl de plaatjesadhaesie aan het subendotheel niet verminderde. Hieruit werd geconcludeerd, dat het middel met name op membraanniveau de plaatjes-plaatjes-interactie remde.

Uit beide bovenstaande onderzoeken wordt geconcludeerd, dat ticlopidine, in tegenstelling tot ASA, een selectief plaatjesremmend middel is, waarvan effect verwacht kan worden in sterk plaatjesbepaalde modellen.

Klinisch overzicht

In de literatuur zijn klinische ervaringen met ticlopidine beperkt voorhanden, hetgeen mogelijk veroorzaakt wordt door de (overigens reversibele) bijwerkingen, zoals icterus, leverfunctiestoornissen alsmede haematologische afwijkingen (thrombopenie, agranulocytose en soms pancytopenie) (De Fraiture et al. - 1982, Ticlopidine review - 1983).

Thebauld et al. (1975) publiceerden het eerste klinische onderzoek en beschreven de effecten van ticlopidine in doseringen variërend van 250

tot 1000 mg/dag/p.o. De ADP-geïnduceerde aggregatie werd voor 50% geremd met een dosis van 450 mg, terwijl 75% remming optrad bij 1000 mg. Op de collageen-geïnduceerde aggregatie werd geen effect vastgesteld, terwijl op de plaatjesadhaesie slechts een beperkt effect aanwezig was. Momenteel zijn geen gegevens voorhanden over de secundaire preventie van het myocardinfarct. Wel werden in de prospectieve studie van Toghi (1984) 340 patiënten gerandomiseerd voor ticlopidine (200 mg/dag/p.o.) of ASA (500 mg/dag/p.o.) waarna het effect op de frequentie van TIA's, RIND's, CVA's en myocardinfarcten na één jaar werd vergeleken. In de ASA-groep bleek het percentage van deze aandoeningen tezamen niet significant hoger dan in de ticlopidine-groep (respectievelijk 29.6 en 19.4).

De resultaten van twee prospectieve trials (TASS en CATS) betreffende de secundaire preventie van TIA's en CVA's zijn helaas nog niet bekend.

Klingeman et al. (1982) constateerden, dat de verhoogde betathromboglobuline- en plaatjesfactor 4-spiegel bij patiënten met claudicatio intermittens met ticlopidine kon worden verlaagd. Deze plaatjes-release-eiwitten worden beschouwd als gevoelige parameters voor de mate van plaatjesaggregatie in vivo. Beïnvloeding van klinische symptomatologie werd echter niet beschreven.

Aukland et al. (1982) randomiseerden 51 patiënten met claudicatio voor ticlopidine (500 mg/dag/p.o.) of een placebo. Hoewel een meetbare remming van de plaatjesaggregatie optrad, werd de betathromboglobuline-spiegel niet beïnvloed. Het plasmafibrinogeen daalde significant, maar niet zodanig dat de viscositeit verminderde. Geconcludeerd werd, dat een eventuele thromboseneiging niet kon worden gecorrigeerd. Na een jaar waren noch de loopafstand noch de dopplerindices significant verbeterd. De resultaten van dit onderzoek sluiten aan bij die van Kirstein et al. (1980), die met ticlopidine (500 mg/dag/p.o., gedurende 4 maanden gegeven) geen verbetering van de loopafstand konden aantonen.

Stiegler et al. (1984) verrichtten bij 43 patiënten een vergelijkbare studie met een follow-up van een jaar (22 placebo, 21 ticlopidine 500 mg/dag/p.o.). Het verloop van de perifere arteriopathie (Fontaine II) werd zowel

bij de aanvang als aan het einde van de studie geobjectiveerd door angiografie. In de behandelde groep werd een significante afneming in de röntgenologische progressie van atherosclerose vastgesteld.

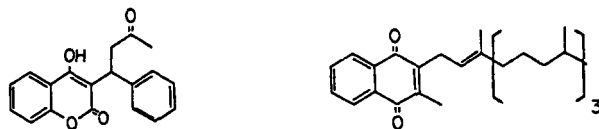
Door Katsumura et al. (1982) werden patiënten met ernstige chronische arteriële occlusies en chronische ulcera aan de benen (veroorzaakt door thrombangiitis en atherosclerosis obliterans) in een multicentrische, dubbelblinde studie behandeld met ticlopidine (500 mg/dag/p.o.). Aan de hand van de grootte van de ulcera, de mate van granulering en de afneming van de pijnklachten, constateerden zij een (niet significante) klinische verbetering in de met ticlopidine behandelde groep.

Concluderend lijkt ticlopidine de thrombo-embolische complicaties gunstig te beïnvloeden. De resultaten van de nog lopende onderzoeken worden afgewacht. Tot op heden kon bij patiënten met claudicatio intermittens onder invloed van ticlopidine (nog) geen verbetering van de symptomatologie worden vastgesteld.

3.5 - WARFARINE

Inleiding

Warfarine, een 3-a-acetylbenzyl-4-hydroxycoumarine, is een synthetisch anticoagulans, dat interfereert met de vorming van vier vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren (factor II, VII, IX, X) en proteïne C en S. De antistollende werking van coumarine-derivaten kan door vitamine K worden geantagoneerd. Gezien de structurele gelijkenis tussen deze beide verbindingen wordt warfarine als een competitieve remmer van vitamine K beschouwd; warfarine remt het vitamine K-epoxyreductase, waardoor de carboxylering van gammaglutaminezuur van het prothrombine-eiwitcomplex wordt verhinderd. Door afwezigheid van deze gammacarboxylglutaminezuurresiduen treedt de calciuminteractie, die noodzakelijk is voor de binding aan membraanfosfolipiden, niet op en wordt de stolling geremd.



Figuur 5 - De structuurformule van warfarine en vitamine K₁.

De functioneel inactieve precursors van de stollingsfactoren, de zogenaamde PIVKA's (proteins induced by vitamin K absence and antagonists), komen hierdoor vrij uit de lever en vervolgens in de circulatie (Sawyer - 1983, Den Ottolander - 1983).

Experimenteel werk

Hoewel anticoagulantia in de kliniek op grote schaal toegepast worden bij ziektebeelden met een belangrijke arteriële-thrombotische component, is opvallend weinig dierexperimenteel onderzoek gedaan naar de effecten van antistolling op arteriële thrombose. Dit kan deels verklaard worden door de belangrijke rol van de plaatjesaggregatie en deels door de hogere bloedingskans bij chirurgische modellen onder invloed van warfarine. Deze twee aspecten kunnen goed geïllustreerd worden aan de hand van een onderzoek van Reijers et al. (1983). Zij implanteerden een plastic "loop" in de aorta bij de rat volgens de methode van Hornstra et al. (1973). In deze "loop" vormt zich een arteriële thrombus en is de tijd tot volledige afsluiting van de "loop" een maat voor de arteriële thrombose-geving. Dit model werd aanvankelijk ontwikkeld voor het in vivo testen van bloedplaatjesfuncties (Hornstra - 1980).

Behandeling van proefdieren met warfarine resulteerde in een hoge mortaliteit, vooral als de warfarinebehandeling een dag vóór of na de chirurgische ingreep werd gestart. Door een onbegrepen interactie tussen antistolling en chirurgische ingreep werd de thrombotestwaarde aanzienlijk verlaagd (van 70% van de overleden dieren was de thrombotest lager dan 5%, tegen 20% bij de overlevenden). In alle groepen was de occlusietijd echter significant verlengd tot gemiddeld tweemaal de occlusietijd van de controlegroep.

In dit model bleek antistolling met warfarine (tot een thrombotestwaarde van 10% bij operatie) even effectief te beschermen tegen arteriële thrombose als de inductie van thrombocytopenie. De in dit model gevormde thrombi toonden een grote histologische gelijkenis met verse arteriële thrombi zoals die bij de mens gevonden worden.

Experimenteel vergelijkend onderzoek naar de effectiviteit van dicoumarol (i.v.) in de preventie van arteriële thrombose liet een significante afne-

ming zien van thrombusvorming op de opzettelijk slecht gehechte vaatnaden van de a. carotis en de a. femoralis bij honden. De prothrombinetijd werd gedurende de proefneming dagelijks ingesteld en onder de 30% gehouden (Kiesewetter et al. - 1948).

Onder invloed van dicoumarol (p.o.) werd arteriografisch een versnelde recanalisatie aangetoond bij thrombose van de a. femoralis van het konijn (prothrombinetijd 25 tot 35 seconden) (Wright - 1953). Thrombose werd geïnduceerd door een geïsoleerd deel van de arterie te comprimeren en thrombine alsmede natriummorrhuaat te injiceren. De behandeling met anticoagulantia werd 24 uur na thrombusinductie aangevangen; na gemiddeld 3.5 weken werd in de behandelde groep recanalisatie gezien en werd bij alle controledieren na 8 weken of langer nog steeds een geoccludeerde arterie aangetroffen. Als verklaring voor dit fenomeen werd een verschuiving in de balans tussen stolling en fibrinolyse ten gunste van fibrinolyse gesuggereerd, terwijl als nevenmogelijkheid tevens een vertraagde organisatie van de thrombus werd gesuggereerd (Wright et al. - 1952, Baeckland - 1959).

De waarde van het gebruik van anticoagulantia vóór en tijdens protheseplaatsing werd experimenteel onderzocht door Gammelgaard et al. (1961); in een groep honden werd na interpositie van een Ivalon-prothese in de a. iliaca communis onder invloed van phenprocoumon (prothrombinewaarde 10 tot 30%) een significant betere doorgankelijkheid geconstateerd dan in de controlegroep (respectievelijk 70% en 10%). Histologisch onderzoek toonde aan dat, in vergelijking met de controlegroep, in de ontstolde groep tevens een duidelijke tendens bestond om pseudo-endotheel te vormen. De technische uitvoering van de vaatreconstructie was in de controlegroep beter dan in de ontstolde groep, zodat het argument betreffende de effectiviteit van anticoagulantia op technisch minder goede vaatreconstructies alleen maar versterkt werd.

Uit het proefschrift van Hamming (1962) bleek, dat de neointima van een bij honden ingebrachte alloprothese in het infrarenale aortatraject met anticoagulantia significant dunner was dan zonder anticoagulantia.

Concluderend bestaan er experimentele aanwijzingen, dat onder invloed van anticoagulantia minder thrombose op arterienaden voorkomt, de recanalisatie in gethromboseerde arteriën sneller verloopt en de neointima zich na protheseplaatsing minder dik ontwikkelt.

Klinische indicaties coumarine-derivaten

Coumarine-derivaten zijn geïndiceerd bij het acute myocardinfarct en de acute cerebrale embolie, wanneer een intracraniale bloeding is uitgesloten. Tevens gelden als indicaties: boezemfibrilleren gecombineerd met een mitraalklepvitium, de aanwezigheid van een kunsthartklep en de acute perifere arteriële embolie. Coumarine-derivaten worden tevens op uitgebreide schaal toegepast bij patiënten met perifere arteriosclerose. De meningen over anticoagulantia als secundaire profylaxe na het myocardinfarct, bij angina pectoris, na aortocoronaire bypassoperaties en als secundaire profylaxe van TIA's, zijn echter verdeeld (Pantely et al. - 1979, Olsson et al. - 1980, Chesebro et al. - 1982, Wessler et al. - 1984, Gebu - 1986).

Hieronder volgt een overzicht van de behandelingsresultaten met anticoagulantia bij het acute myocardinfarct, de secundaire preventie van het myocardinfarct en recidiverende TIA's en CVA's alsmede van de perifere vasculaire aandoeningen.

Coumarine-derivaten bij het acute myocardinfarct

Bij secundaire profylaxe is het de vraag, of de patiënt na een hartinfarct een betere overlevingskans heeft door behandeling met anticoagulantia. Na het acute infarct treedt een snelle patiëntselectie op, aangezien de vroege dood vooral wordt bepaald door ritmestoornissen en falen van de pompfunctie van het hart (Mitchell - 1969).

Evaluatie van de gepubliceerde onderzoeken is echter minder goed mogelijk wegens het ontbreken van voldoende informatie over de intensiteit van de antistolling en het aantal recidieven alsmede de niet aselechte behandeling van de patiëntengroepen.

Een significante afneming van de mortaliteit onder invloed van anticoagulantia in de eerste 4 weken na het infarct kan niet worden aangetoond (Honey et al. - 1957, Medical Research Council - 1969, Veteran Administration Cooperative Clinical Trial - 1973).

In het retrospectieve onderzoek van Honey et al. (1957) werd geconcludeerd, dat het gebruik van anticoagulantia bij het acute infarct niet resulteerde in een afneming van de mortaliteit. In deze studie vond echter selectie plaats op basis van de klinische prognose en werd geen melding gemaakt van de mate van antistolling.

In het prospectieve, multicentrische, niet-dubbelblinde onderzoek van de Medical Research Council (1969) werd onder invloed van phenindion gestreefd naar een thrombotestwaarde (Owren) van 15%. In deze groep bleek de thrombotestwaarde bij 77% van de patiënten lager dan 20%. Bij vergelijking van de behandelde groep (n=712) met de laag gedoseerde groep (n=715, phenindion 1 mg/dag) bleek noch een significante afneming van de mortaliteit noch een verschil in reïnfarcering.

In de Veterans Administration Cooperative Clinical Trial (1973) werden 500 patiënten met warfarine en 499 patiënten met een placebo behandeld. Controle werd uitgevoerd aan de hand van de prothrombinetijd (Quick), waarbij werd gestreefd naar 25 tot 30 seconden. Ten voordele van de behandelde groep werd een verschil van 2% in totale mortaliteit en 1.4% in reïnfarcering vastgesteld.

Retrospectief onderzoek van 2330 patiënten in 22 ziekenhuizen in Israël liet binnen 21 dagen na een myocardinfaarct een mortaliteit zien van 8.3% in de behandelde groep en 27.3% in de placebogroep. Nadat de binnen de eerste 48 uur overleden patiënten waren uitgeselecteerd, bedroeg de mortaliteit respectievelijk 6.4 en 17.2% (Modan et al. - 1975). Helaas werd noch melding gemaakt van de vorm of de mate van antistolling, noch van het percentage reïnfarcering.

In de VS werd een vergelijkbaar retrospectief onderzoek uitgevoerd door Tonascia et al. (1975): Van een groep patiënten (n=1156) met een acuut myocardinfaarct kreeg 41.8% een (onbekend) anticoagulans. De keuze van antistolling was selectief (leeftijd, sexe, ras, aard van de kliniek). In dit onderzoek ontbraken echter zowel de controlegegevens van de antistolling als het percentage reïnfarcering. Tijdens opname in het ziekenhuis overleed 10.8% van de met anticoagulantia behandelde patiënten en 26.7% van de onbehandelde patiënten. Zelfs na meervoudige aanpassing aan demografische factoren, klinische ernst van de ziekte en bijvoorbeeld opname op een reguliere verpleegafdeling of coronary care unit, bleek de mortaliteit in de behandelde groep 2.5 maal lager dan in de controlegroep. Na analyse van zes gerandomiseerde trials over een periode van 30 jaar kwamen Chalmers et al. (1977) tot een gemiddelde mortaliteit van 19.6% voor de controlegroep en 15.4% voor de behandelde groep: een reductie van 4.2%. Echter, het gemiddelde van de percentages uit de verschillende

studies levert geen betrouwbare informatie op, omdat aan de resultaten van de kleine trials evenveel waarde wordt gehecht als aan de resultaten van de grote trials (Mitchell - 1984) en tevens omdat de mate van antistolling vaak onvoldoende gedocumenteerd is.

Behandeling met anticoagulantia na het acute myocardinfarct met als doel een recidief te voorkomen, wordt door bovenstaande resultaten niet voldoende ondersteund; wèl is deze behandeling geïndiceerd bij patiënten met een hoog risico voor veneuze of arteriële thrombo-embolisering (Chalmers - 1977, Mitchell - 1984, Gallus - 1986).

Secundaire preventie van het myocardinfarct op lange termijn

De meningen over het effect van anticoagulantia bij de secundaire preventie van het myocardinfarct op lange termijn zijn verdeeld (Mitchell - 1981/1984, Loeliger - 1985). De voorstanders van behandeling met anticoagulantia beroepen zich op de conclusies van de International Anticoagulant Review Group (1970), het Nederlandse onderzoek van de Sixty Plus Reinfarction Study Research Group (1980) en de studie van Bertèle (1985). De tegenstanders beroepen zich op het ontbreken van een significante afneming van de mortaliteit onder invloed van anticoagulantia (May et al. - 1982, Mitchell - 1984).

Alleen bij de Sixty Plus Study is de mate en intensiteit van de antistolling voldoende gedocumenteerd. In deze studie wordt het effect van het continueren van anticoagulantia (acenocoumarine en phenprocoumon) na een myocardinfarct vastgesteld en vergeleken met het effect van het na 6 maanden staken van de behandeling. Het betrof een gerandomiseerd, multicentrisch, dubbelblind onderzoek van 439 patiënten ouder dan 60 jaar met een follow-up van 2 jaar; bij deze groep werd de behandeling met anticoagulantia gecontinueerd, waarna vergelijking plaatsvond met een placebogroep (n=439). In de behandelde groep varieerden de thrombotestwaarden van 107 tot 180 seconden. In de placebogroep bedroeg de mortaliteit na 2 jaar 13.4% en in de behandelde groep 7.6%. De 2-jaars incidentie van een recidief infarct bedroeg in de placebogroep 15.9% en in de behandelde groep 5.7%. De incidentie van intracranieële complicaties was 5.6% in de placebogroep en 3.1% in de behandelde groep. In deze groep kwam een groter aantal haemorrhagische CVA's voor (7 met een mortali-

teit van 4) dan in de placebogroep (1 met een mortaliteit van 1), maar trad een verlaging op van het aantal niet-haemorrhagische CVA's, namelijk in de behandelde groep 2 (met een mortaliteit van 1) en in de placebogroep 13 (met een mortaliteit van 3). De auteurs wezen herhaalde malen op het belang van goed gecontroleerde intensieve antistolling; tevens werden de negatieve resultaten van de British Medical Research Council (1969), de trial van Breddin et al. (1980) en de EPSIM Research Group (1982) bekritiseerd vanwege de onvoldoende mate van antistolling (Loeliger - 1983).

De risico's van langdurig gebruik van anticoagulantia (toeneming van het aantal intracranieële bloedingen) worden gemitigeerd door de afnemng van het aantal CVA's, waarschijnlijk deels afkomstig vanuit de a. carotis en deels vanuit het hart (Loeliger - 1983, Second Report van de Sixty Plus Reinfarction Study - 1982).

In de secundaire preventie van het myocardinfarct op lange termijn kan derhalve concluderend gesteld worden, dat effectiviteit van antistolling afhankelijk is van behandeling onder stabiele en nauwkeurige thrombotestwaarden van 5 tot 10%; deze waarden komen overeen met 4.8 tot 3.5 INR (international normalized ratio).

Coumarine-derivaten bij arteriële thromboembolieën, met name TIA's

In "Guidelines for the management of TIA's" beschreven Sandok et al. de tot 1978 bekende onderzoeken met betrekking tot de behandeling met anticoagulantia; het betrof met name gegevens uit kleine, niet-gerandomiseerde trials, waarbij geen duidelijk voordeel van anticoagulantia kon worden vastgesteld.

Aangenomen wordt, dat 25 tot 40% van de patiënten binnen 5 jaar na een eerste TIA een cerebraal infarct krijgt, met de hoogste incidentie gedurende het eerste jaar na het begin van de TIA's (Millikan - 1980).

In een prospectief, gerandomiseerd, multicentrisch onderzoek vergeleken Olsson et al. (1980) de invloed van coumadine met een combinatie van ASA (2x500 mg) en dipyramidol (2x75 mg) in de preventie van een cerebraal infarct bij patiënten met TIA's of RIND's. Dit onderzoek omvatte 135 patiënten, waarin 68 patiënten gedurende 2 maanden behandeld werden met anticoagulantia gevolgd door aggregatieremmende middelen; de overige

67 patiënten werden behandeld met alleen anticoagulantia. Controle vond plaats op basis van de thrombotest met een therapeutische instelling van 7 tot 15%; informatie betreffende de effectiviteit van de antistolling werd echter niet gegeven. In de met anticoagulantia behandelde groep overleed 1 patiënt na 5 maanden aan een cerebraal infarct bij een goed ingestelde thrombotestwaarde van 8% en een goed gereguleerde hypertensie. TIA's of RIND's traden op bij 9 patiënten (6.7%) in de met anticoagulantia behandelde groep en bij 13 patiënten (9.6%) in de groep behandeld met plaatjesremmende middelen. Bloedingscomplicaties met ziekenhuisopname kwamen in de coumadinegroep voor bij 6 patiënten (8%) en in de groep behandeld met plaatjesremmende middelen bij 3 patiënten (4.5%). Tussen de groepen bestond geen significant verschil in het optreden van cerebrale infarcten. Ter voorkoming van herseninfarcten kan op basis van de huidige literatuur gesteld worden, dat het niet is geïndiceerd om anticoagulantia voor te schrijven bij patiënten met TIA's (v.Gyn et al. - 1982/1984, Gallus - 1986).

Coumarine-derivaten bij perifere vasculaire aandoeningen, in het bijzonder claudicatio intermittens

Ongeveer 8% van de bij de Nederlandse Thrombosedienst ingeschreven patiënten krijgt anticoagulantia voorgeschreven op basis van de indicatie claudicatio intermittens (Jaarverslag Nederlandse Thrombosedienst, 1985). Op arteriografische gronden beschreef Tillgren (1965) bij 255 patiënten een positief effect van phenprocoumon op het open blijven van gesteno-seerde aa. femorales superficialis. Voor deze groep werd de ontwikkeling van occlusies en thrombusappositie geremd indien de prothrombinetijd (Owren) gedurende 80% van de behandelingsduur 10 tot 15% bedroeg. Het prospectieve onderzoek van Hamming (1966) werd als verenigings-verslag in het Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde gerefereerd. Bij 130 patiënten met perifere sclerose, allen gedurende een half jaar behandeld met anticoagulantia, werd na verdeling in een behandelde en een placebogroep, het effect van respectievelijk behandeling met en staken van antistolling bestudeerd. Na 15 maanden werd het onderzoek afgebroken omdat de verschillen tussen de twee groepen in morbiditeit en mortaliteit te groot werden: in de behandelde groep overleden 2 patiënten en in

de placebogroep 8 patiënten; tevens werd in de placebogroep op anamnestiche gronden ernstige progressie van het ziektebeeld vastgesteld. Hoewel de statistische bewerking van de resultaten onvolledig was, was dit voldoende reden om patiënten met claudicatio langdurig met anticoagulantia te behandelen. Op basis van de tot 1976 bestaande literatuur, stelden Van Vroonhoven et al., dat alleen patiënten met een gestenoseerde a. femoralis superficialis baat zouden hebben bij behandeling met anticoagulantia. In een 5-jaars prospectief, dubbelblind onderzoek van De Smit (1988) werden 155 patiënten wegens claudicatioklachten (93% Fontaine II) behandeld met phenprocoumon en vergeleken met 145 placebopatiënten. Na 5 jaar bleek de progressie van het vaatlijden (geobjectiveerd met dopplersonderzoek) in de behandelde groep significant (met een factor 6) verlaagd te zijn van 19 naar 3%.

Uit bovenstaand onderzoek blijkt langdurige behandeling met orale anticoagulantia (phenprocoumon) de progressie van perifeer atherosclerotisch vaatlijden te voorkomen of te vertragen. Opvallend was, dat het aantal bloedingscomplicaties zeer laag was en dat hierbij in geen der gevallen chirurgische interventie noodzakelijk was.

Concluderend, kan de vraag of therapie met coumarine-derivaten zinvol is, op basis van de literatuurgegevens slechts ten dele positief worden beantwoord. Slechts de Sixty Plus Reinfarction Study en de studie van De Smit zijn goed gedocumenteerd; bij de andere studies ontbreekt (voldoende) informatie over de mate en intensiteit van de antistolling, vindt geen randomisatie plaats of wordt het effect van anticoagulantia gecorreleerd aan indirecte klinische parameters (zoals de totale mortaliteit).

3.6 - PLASMINOGEENACTIVATOR

Inleiding

Reeds gevormde thrombi kunnen gelyseerd worden door de fibrinmatrix van de thrombus (die ook de cellulaire bestanddelen van de thrombus samenhoudt) af te breken. Deze fibrinolyse berust op proteolytische afbraak door het enzym plasmine, dat uit het circulerende plasminogeen gevormd kan worden door plasminogeenactivatoren.

Klinisch zijn hiervoor vier typen plasminogeenactivatoren beschikbaar:

- het streptokinase (SK), dat met plasminogeen een complex vormt, dat in staat is om plasminogeen om te zetten in plasmine
- het urokinase (UK), een directe plasminogeenactivator, en het pro-urokinase (pro-UK), een nog inactieve pro-vorm van urokinase, die door plasmine tot urokinase geactiveerd kan worden
- de weefseltype-plasminogeenactivator (t-PA): een directe fibrine-afhankelijke plasminogeenactivator
- het gevormd SK-plasminogeencomplex: een directe plasminogeen-activator, en (meer recent) een geacyleerde vorm: APSAC

Klinisch overzicht

De meeste ervaring is tot op heden opgedaan met het lyseren van coronairthrombi bij het acute myocardinfarct. Zowel SK (GISSI-trial - 1987, ISIS-2-trial - 1987), APSAC (AIMS-trial - 1988) als t-PA (TIMI-1-trial - 1985/1987, Verstraete et al. - 1985, de Australische trial - 1988) bleken in staat om bestaande coronairthrombi snel (meestal binnen 60 minuten na toediening) te lyseren.

Behandeling met SK of APSAC resulteerde in een toegenomen overleving, vooral wanneer patiënten binnen drie uur na de eerste verschijnselen van het myocardinfarct behandeld werden. Er zijn nog geen gegevens bekend over het effect van behandeling van t-PA op de overleving. Wel is voor alle drie typen plasminogeenactivatoren een verbetering van de hartfunctie vastgesteld. Welke van de beschikbare plasminogeenactivatoren uiteindelijk het beste resultaat op de overleving en de hartfunctie zal hebben, is op dit moment nog onduidelijk (Editorial Lancet, 1988).

Om het gebruik en de risico's van plasminogeenactivatoren bij het herseninfarct te kunnen beoordelen, zijn nog onvoldoende gegevens bekend (Del Zoppo et al. - 1986, Sloan - 1987).

Plasminogeenactivatie met t-PA bij perifeer vaatlijden

De ervaring met het klinisch gebruik van plasminogeenactivatoren bij perifeer vaatlijden is slechts beperkt. Graor et al. (1987) bestudeerden het effect en de veiligheid van recombinant t-PA in twee doseringen (0.05 en 0.1 mg/kg/uur) bij patiënten met gethromboseerde beenarteriën en over-

bruggingsplastieken. Van de 55 patiënten met ernstige ischaemie, hadden 29 patiënten een vaatoperatie ondergaan; uit deze subgroep werd bij 21 patiënten een overbruggingsplastiek aangelegd. Direct voorafgaand aan de behandeling ondergingen 4 patiënten een incomplete thrombo-embolctomie. Het recombinant t-PA werd door een angiografiecatheter direct in de gemiddeld 7.5 dagen oude thrombus geïnfundeerd. De infusieduur bedroeg gemiddeld 4.7 uur (1 tot 8 uur). Bij 51 patiënten (93%) trad thrombolysc op, maar kon geen verschil tussen de beide doseringen worden vastgesteld; in de overige 4 gevallen trad geen thrombolysc op (tweemaal in elke doseringsgroep). Bij 48 (94%) van de 51 patiënten trad na thrombolysc een angiografische en klinische verbetering op, terwijl bij de niet-geslaagde pogingen geen klinische verslechtering werd vastgesteld. In 29 gevallen (57%) was een secundaire procedure noodzakelijk (operatie dan wel ballonangioplastiek). Als (min of meer) ernstige complicaties werden bij 3 patiënten haematomen gezien. Opvallend was, dat enerzijds de tijdsduur waarin de lysis optrad aanmerkelijk korter was dan bij overeenkomstige met streptokinase behandelde patiënten (respectievelijk gemiddeld 5.1 en 51.3 uur) en dat anderzijds het succes van de thrombolysc met recombinant t-PA niet werd beïnvloed door de leeftijd van de thrombus.

De indicatie voor behandeling met t-PA van gethromboseerde perifere arteriën en vaatplastieken is nog niet vastomlijnd en kan in de volgende gevallen worden overwogen:

- bij patiënten met arteriële thrombi of embolieën in niet voor catheter thrombo-embolctomie bereikbare arteriën
- in plaats van een balloncatheter-thrombectomie bij patiënten met gethromboseerde veneuze overbruggingsplastieken, zodat het endotheel minder beschadigd wordt, met als gevolg een lagere thrombogeniciteit
- bij patiënten met een ischaemisch been, dat angiografisch door occlusie van crurale takken als inoperabel wordt beschouwd

HOOFDSTUK 4 - EXPERIMENTEEL MODEL

4.1 - HET AORTAFLAPMODEL

In 1982 introduceerde Van Aken het aortaflapmodel, dat aan de voorwaarden voor een arteriëel thrombosemodel voldoet.

Deze voorwaarden kunnen als volgt worden geformuleerd:

1. Vorming van een in principe gestandaardiseerde thrombus.
2. Aanwezigheid van een pathofysiologisch adequate (endogene) stimulus.
3. Activatie van plaatjes, stolling en fibrinolyse.
4. Beïnvloeding van de haemodynamiek.
5. Aanwezigheid van histologische overeenkomsten met de humane pathologie.
6. Accurate meetbaarheid van de thrombus.

ad 1. - Vorming van een in principe gestandaardiseerde thrombus. In dit model wordt bij de rat een deel van de aortawand ("de flap") operatief naar binnen geklapt in de richting van de bloedstroom. In alle gevallen wordt een thrombusreactie opgewekt zonder dat gebruik gemaakt wordt van exogeen materiaal, behoudens niet-reactieve hechtingen. Uit lichtmicroscopisch onderzoek bleken noch deze hechtingen noch de gebruikte microvasculaire clips aanleiding te geven tot thrombose. Een nauwkeurige beschrijving van dit model wordt gegeven in hoofdstuk 5.

ad 2. - Aanwezigheid van een pathofysiologisch adequate (endogene) stimulus. In tegenstelling tot in het aortaflapmodel, wordt thrombose in andere modellen door een exogene stimulus geïnduceerd in een gedeelte van de arteriële vaatboom. Deze stimulus kan medicamenteus, chirurgisch, electrisch of thermisch (laser) van aard zijn dan wel opgewekt worden door expositie van bloed aan een vreemd oppervlak (Inokuchi et al. - 1961, Henry - 1962, Born Cross - 1963, Baumgartner - 1973, Didisheim - 1972, Arfors et al. - 1973, Hladovec - 1973, Hornstra - 1973, Philp - 1981). De kritiek op deze modellen bestaat uit het feit, dat thrombus-inductie plaatsvindt op basis van een stimulus, die de opeenvolging van de pathofysiologische gebeurtenissen waarschijnlijk niet adequaat verte-

genwoordigt. Daarnaast wordt door de met deze modellen geïnduceerde de-endothelialisatie van het vat slechts aan één voorwaarde voldaan, namelijk het bewerkstellingen van veranderingen in de vaatwand. In de bloedstroom treden dan geen ernstige veranderingen op, behoudens in die modellen waarin ingrijpende exogene stimuli gebruikt worden, zoals de introductie van catheters in het vat of het gebruik van een "aortic loop".

ad 3. - Activatie van plaatjes, stolling en fibrinolyse. Het aortaflapmodel heeft de eigenschappen van een arteriële anastomose, waarop een thrombus ontstaat. Door de aanwezigheid van een intraluminale flap met thromboplastisch materiaal, worden stolling en fibrinolyse in gang gezet en vindt plaatjesactivatie plaats.

ad 4. - Beïnvloeding van de haemodynamiek. Op basis van theoretische overwegingen veroorzaakt de flap belangrijke haemodynamische veranderingen: door (subtotale) stenosering en toeneming van de bloedstroomsnelheid neemt de "shear stress" toe en door de acute diametertoeneming achter de flap treedt turbulentie op.

ad 5. - Histologische overeenkomsten met de humane pathologie. Het vaatwandtrauma in het aortaflapmodel is vergelijkbaar met de humane situatie, waardoor de thrombus op de flap histologisch vergelijkbaar is met de humane thrombus (Van Aken en Emeis - 1982).

ad 6. - Accurate meting van de thrombus. In de verschillende modellen wordt de mate van thrombose gemeten aan de hand van verschillende parameters, zoals het lichtmicroscopisch vaststellen van het percentage thrombusoppervlak ten opzichte van het lumenoppervlak, het electronenmicroscopisch vastleggen van de plaatjesaggregatie, de embolisatieratio, het aantal laserschoten benodigd voor thrombusinductie, thrombusoppervlakte- en gewichtsmeting, meting van de temperatuur, meting van gelabelde Cr51-plaatjesaccumulatie per oppervlaktemaat en (als minst betrouwbare meting) het vaststellen van de zogenaamde "visual patency score" (Philp - 1981). In het aortaflapmodel worden zowel stimulus als thrombus morfometrisch zeer accuraat bepaald, waardoor zij gekwantificeerd kunnen worden.

Samenvattend komen de eigenschappen van het aortaflapmodel, in tegenstelling tot de andere modellen, op een groot aantal punten overeen met de humane pathologie. Vergelijking van de mate van beïnvloeding van thrombose in de extrapolatie van de dierlijke naar de humane situatie is echter in het algemeen niet eenvoudig en aan kritiek onderhevig. Overigens verschilt het thrombogene mechanisme van het zoogdier slechts weinig van dat van de mens en hebben mens en rat in het bijzonder een goed vergelijkbaar thromboplastisch en fibrinolytisch systeem (Astrup et al. - 1962, Didisheim - 1972).

4.2 - DE SAMENHANG MET DE VAATCHIRURGIE

Vaatreconstructies kunnen falen op korte en lange termijn.

Het falen van vaatreconstructies op korte termijn

Het binnen enkele weken na de ingreep mislukken van een vaatreconstructie berust in het algemeen op technische fouten tijdens de procedure dan wel op onvoldoende in- of uitstroom.

Volgens Piepgras (1967) is een zekere mate van thromboseering onontkoombaar en spelen factoren, zoals het plaatsen van vaatklemmen en de instrumentele behandeling van het vaatweefsel, een rol.

Het succes van een vaatreconstructie wordt echter eveneens bepaald door de aard van de gebruikte materialen, waarbij biocompatibiliteit en thrombogeniciteit van belang zijn. In vergelijking met een alloprothese, is een autologe vene derhalve superieur: één maand na een femoropopliteale reconstructie bedraagt het occlusiepercentage voor een vene ongeveer 5 en voor een alloprothese ongeveer 20 (Darling - 1972, Callow - 1982). Anders dan bij het gebruik van prothesen van een groot kaliber bij centrale reconstructies, treedt thromboseering frequenter op in prothesen van een klein kaliber, die onder het liesniveau ingebracht worden (Sauvage et al. - 1980). Naast de genoemde thrombogeniciteit van het gebruikte materiaal, speelt de bloedstroomsnelheid hier een belangrijkere rol. Sauvage (1979) introduceerde het begrip "thrombotic threshold velocity", waaronder die bloedstroomsnelheid wordt verstaan, waarbij een arteriëel substituuut begint te thromboseren. Deze kritische bloedstroomsnelheid wordt veroorzaakt door onvoldoende in- en uitstroom (zoals bijvoorbeeld bij een klein achterliggend debiet).

De thrombogeniciteit van veneuze transplantaten wordt in sterke mate bepaald door de effecten van de voorbehandeling op het endotheel. Zo is voorbehandeling met bloed of plasma minder schadelijk voor het endotheel dan gebruik van fysiologisch zout en zijn ook factoren zoals het mechanisch trauma en de ischaemietijd van belang (Cambria et al. - 1984, Callow - 1984, Haimovici - 1984, Cambria et al. - 1985).

De mate van endotheelbeschadiging is tevens afhankelijk van haemodynamische factoren onder invloed van het arterialiseren van een vene. Evenals in omgekeerd ingehechte veneuze transplantaten, vertonen in-situ venen na ongeveer een dag endotheelverlies en plaatjesaggregatie; het endotheel is overigens bij beide technieken na ongeveer twee weken weer hersteld (Cambria et al. - 1984).

Het behoud van intact endotheel is ook theoretisch aantrekkelijk omdat de prostacyclineproductie en fibrinolytische activiteit intact blijven. Dit leek bij toepassing van de in situ-techniek gemakkelijker bereikt te worden dan indien de vene werd uitgenomen en vervolgens omgekeerd weer werd ingebracht (Bush et al. - 1984). Toch worden ook een verlaagde prostacyclineproductie en een toegenomen thromboxaanconcentratie aangetroffen in de in situ-venen (Bush - 1986).

Thrombusvorming in alloprothesen begint met plaatjesadhaesie en -aggregatie en wordt (door het ontbreken van prostacycline) gepotentiëerd door thromboxaan (Gloviczki - 1986). In een later stadium wordt prostacyclineproductie aangetroffen in de neointima van dacronprothesen, waarin de productie echter beduidend lager is dan in een normale arterie (Sharp et al. - 1986). Het oppervlak van een ingebrachte prothese wordt slechts zelden bekleed met een volledige endotheellaag en de plaatjesaccumulatie (gemeten met behulp van 111-Indium gelabelde plaatjes) blijft gedurende maanden tot jaren aanwezig (McCollum et al. - 1981, Goldman - 1982/1983). Het lijkt dus zinvol om het effect van plaatjesremmers of anticoagulantia op de thrombogenese bij de verschillende materialen vast te stellen.

McCollum et al. (1985) vergeleken het effect van de combinatie van ASA (3x300 mg) en dipyramidol (3x75 mg) op het zich hechten van 111-Indium gelabelde plaatjes op drie typen overbruggingsmaterialen (omgekeerde veneuze prothesen, dacronprothesen en PTFE-prothesen) aangebracht in het femoropopliteale traject. Bij alle patiënten werd 48 uur prae-operatief

begonnen met bovengenoemde medicatie, die alleen bij patiënten met een prothese gedurende twee weken na ontslag uit de kliniek werd gecontinueerd. Hoewel ASA en dipyridol geen effect bleken te hebben op de plaatjesaccumulatie in de veneuze plastieken, was de thrombogeniciteit in de alloplastieken sterk gereduceerd. De doorgankelijkheid na één jaar correleerde sterk met de mate van plaatjesaccumulatie direct na het inbrengen van de prothese. Met name indien thrombose wordt verwacht door ernstige afwijkingen in het uitstroomgebied, is het doel van de medicatie tweeledig, namelijk verlaging van de thrombogeniciteit van zowel de vaatplastiek als van het achterliggende atherosclerotische vaattraject (Hess - 1985, McCollum et al. - 1985, Bollinger et al. - 1985).

Bij vaatchirurgische anastomosen bestaat het risico, dat ook subendotheliale structuren in aanraking komen met de bloedstroom, met thrombose tot gevolg. Bij een endarteriectomie wordt een groot oppervlak van de media blijvend aan de bloedstroom blootgesteld. Endarteriectomie van een atherosclerotische arterie over een kort traject (zoals bij desobstructie van de a. carotis of a. femoralis profunda) leidt slechts zelden tot volledige thrombose. Dezelfde procedure, uitgevoerd over een langer traject (zoals bijvoorbeeld over meer dan 15 cm in het bovenbeen), leidt echter tot re-occlusie door thrombose (Darling - 1972, Terpstra - 1972, Vollmar - 1980, Haimovici - 1984).

In de preventie van vroege occlusies van coronairarteriën na bypasschirurgie toonden Chesebro et al. (1982, 1983, 1986) aan, dat het preoperatief starten met een combinatie van ASA (3x325 mg/dag) en dipyridol (3x75 mg) zeer effectief was: één maand postoperatief bedroeg het occlusiepercentage per bypass voor de behandelde groep 5 (n=368) en voor de placebogroep 18 (n=370). Vergelijking van de groep behandeld met ASA en dipyridol met een coumarinegroep liet een daling van 60% in de occlusiefrequentie zien ten voordele van de eerstgenoemde groep. Behandeling met alleen ASA 100 mg per dag, liet eveneens een significante afneming van het aantal occlusies zien op de distale anastomose. Na 4 maanden bleek 90% van de plastieken open in de ASA-groep en 68% in de placebogroep (Lorentz et al. - 1984). Limet et al. (1987) toonden angio-

grafisch aan, dat ticlopidine (2x250 mg/dag/p.o., vanaf de tweede post-operatieve dag gegeven) het occlusiepercentage van coronaire overbruggingsplastieken (n=475) significant verminderde ten opzichte van een placebo. Op de tiende dag bedroeg het occlusiepercentage respectievelijk 7.1 en 13.4, na een half jaar 15.0 en 24.0 en na een jaar 15.9 en 26.1. In de genoemde studies van Chesebro en Lorenz werd 24 uur prae-operatief begonnen met de behandeling. Indien de vroege interactie van plaatjes een rol speelt in de ontwikkeling van thrombose ter plaatse van de anastomose en in de graft, is hier in deze studies rekening mee gehouden.

Prospectief onderzoek naar plaatjesremming bij perifere reconstructies werd beschreven door Kester (1984) en Donaldson et al. (1985). Na inbrengen van femoropopliteale supra- en infragenuale dacronprothesen was de cumulatieve doorgankelijkheid met een combinatie van ASA en dipyramidol (respectievelijk 3x330 mg en 3x75 mg, prae-operatief gestart) bij patiënten met invaliderende claudicatio (n=26) na een jaar 85% en voor de placebogroep (n=37) 56% . Tevens werd vastgesteld, dat occlusie in beide groepen in de helft van de gevallen in de eerste drie maanden optrad. Clyne et al. (1987) stelden bij 55 patiënten vast, dat prae-operatief ASA (300 mg/dag) gecombineerd met dipyramidol (400 mg/dag), gedurende 6 weken postoperatief gegeven (n=29, placebogroep n=26), met name het doorgankelijkheidspercentage in het eerste jaar van de ingebrachte navelstrengvene, PTFA- of dacronprothese tezamen verhoogde van 53% naar 85%. Het positieve effect ontstond in de eerste behandelingsmaand, dat wil zeggen in die periode waarin de prothese maximaal thrombogene is (Goldman et al. - 1983). Een verbetering van de doorgankelijkheid van veneuze overbruggingsplastieken kon niet worden aangetoond. De doorgankelijkheid van femorodistale alloplastieken op korte termijn werd positief beïnvloed door bovengenoemde medicatie en de resultaten benaderen die van de veneuze plastieken.

Het falen van vaatreconstructies op lange termijn

Het optreden van late occlusies is afhankelijk van de progressie van het onderliggend lijden en de ontwikkeling van neointimahyperplasie (Imparato - 1972, Oblath - 1978). Deze neointimahyperplasie ontwikkelt zich snel-

ler dan en verschilt histologisch van atherosclerose. Endotheelbeschadiging ontstaat bij het chirurgisch manipuleren tijdens prothese-implantatie of wordt geïnduceerd door een turbulente bloedstroom ter plaatse van de anastomose door bijvoorbeeld een "mismatch" tussen prothese en arterie (McCann et al. - 1980, Gloviczki et al. - 1986).

Op plaatsen waar het endotheel is beschadigd, aggregeren de plaatjes en komen substanties vrij (bijvoorbeeld de mitogene factor ofwel de "platelet derived growth factor"), hetgeen de gladde spiercellen aanzet tot migratie en proliferatie (Ross en Vogel - 1978, Harker et al. - 1981, Thomas - 1983).

Hagen et al. (1982) onderscheidden twee localisaties van hyperplasie: de vroege vorm, die zich uit de gevormde plaatjethrombus in de prothese zelf ontwikkelt, en de late vorm, die zich voornamelijk lokaal op de distale anastomose ontwikkelt en minder plaatjesafhankelijk zou zijn, maar meer beïnvloed wordt door bloedstroomveranderingen en arteriële drukken. De genoemde veranderingen bepalen, naast de progressie van atherosclerose in het in- en uitstroomtraject, de doorgankelijkheid op langere termijn (Whittemore et al. - 1981). De doorgankelijkheid wordt positief beïnvloed door behandeling met coumarine en ASA (Waibel - 1976, Albert et al. - 1982, Kretschmer et al. - 1986).

Studies naar het effect van aggregatieremmende middelen op lange termijn zijn beperkt voorhanden. Een vergelijkend onderzoek tussen coumarine en ASA werd gepubliceerd door Albert et al. (1982). Na thrombendarteriëctomie in het femoropopliteale traject, werd van 6 weken tot 2 jaar post-operatief onder invloed van ASA 3x500 mg (n=37) en coumarine (n=28) een gelijk-cumulatieve doorgankelijkheid van 80% bereikt. Na bypassoperaties (n=10) was coumarine in het voorkòmen van occlusies vanaf het begin van het onderzoek beter werkzaam.

Kritiek op deze studie is veelvoudig mogelijk: de studie was niet dubbelblind opgezet, de sexe-verdeling werd niet vermeld, de coumarine-instelling was bij 48% van de patiënten onvoldoende (prothrombinewaarde boven de 30%) en het aantal bypassprocedures met autoloog veneus materiaal werd niet vermeld.

Hoewel in de studie van Kretschmer et al. (1986) de antistollingsbehan-

deling (thrombotestwaarde 5 tot 12%) na veneuze overbruggingsplastieken geen effect bleek te hebben op patiënten met claudicatio (Fontaine II-III), bleek wèl een positieve invloed te bestaan bij "limb salvage" (Fontaine III-IV). Patiënten met een ledemaatsbedreigende ischaemie en een slechte arteriografische uitstroom hebben dus baat bij medicatie, die de stolling van het bloed beïnvloed.

Green et al. (1982) bestudeerden het effect van ASA (alleen of met dipyramidol) op de doorgankelijkheid van infra-inguinale PTFE-prothesen voornamelijk bij "limb salvage" over een periode van een jaar, waarbij prae-operatief aangevangen werd met een combinatie van ASA 325 mg/dag en dipyramidol 225 mg/dag. In 41% van de gevallen trad occlusie van de prothese op, hetgeen voornamelijk veroorzaakt werd door fibreuze neointimahyperplasie op de anastomosen. Bij reconstructies boven de knie (n=26) bleek de cumulatieve doorgankelijkheid onder invloed van de medicatie na een jaar significant te verschillen van de placebogroep (n=9): in de ASA-groep (alleen of met dipyramidol) (n=17) 100% en in de placebo-groep 50%. Voor reconstructies onder het kniegewricht werd geen statistisch significant verschil gevonden, hoewel de ASA-groep een hogere cumulatieve doorgankelijkheid (65%) liet zien dan de placebo- (n=8) en de combinatiegroep (n=9) (respectievelijk 19% en 21%).

Na endarteriectomie van de a. carotis wordt het aantal symptomatische recidiefstenosen geschat op 1 à 2% (Stoney et al. - 1976, Thomas et al. - 1985, Piepgras et al. - 1986). Uit non-invasief onderzoek blijkt, dat asymptomatische recidiefstenosen echter voorkomen in variërende percentages tot 50 (Barnes - 1985). De binnen een jaar optredende stenosen worden voornamelijk veroorzaakt door intimahyperplasie, terwijl de latere stenosen ontstaan door progressie van atherosclerose (Stoney et al. - 1976, Thomas et al. - 1985).

Onderzoek van Edwards et al. (1985) liet zien, dat een postoperatieve hemiparese in de helft van de gevallen veroorzaakt werd door een occluderende thrombus op het gedesubstrueerde segment van de a. carotis. Zij behandelden 395 patiënten (554 endarteriectomiën) met ASA (995 mg/dag) en dipyramidol (150 mg/dag) en vergeleken deze groep met 189 patiënten

(240 endarteriectomiën), die één jaar tevoren waren geopereerd zonder behandeling met aggregatieremmers. In de behandelde groep trad geen thrombose op, terwijl in de controlegroep 6 gevallen van thrombose ring werden vastgesteld, zonder dat daarvoor een technische oorzaak werd gevonden. In beide groepen werd overigens bij 70% van de patiënten een dacronpatch gebruikt. Behoudens deze studie naar het effect van ASA op de directe postoperatieve thrombusvorming, zijn geen studies bekend over het effect van ASA op de intimahyperplasie.

Bij femoropopliteale endarteriectomiën zijn de resultaten van twee prospectieve onderzoeken (Ehresmann et al. - 1977, Bollinger et al. - 1985) opmerkelijk.

In het prospectieve dubbelblind onderzoek van Ehresmann et al. werd het effect van ASA (1500 mg/dag) op de reocclusie van voornamelijk femoropopliteale thrombendarteriectomiën na één jaar vastgesteld en vergeleken met een placebogroep. In 74% van de gevallen (n=428) bestond de operatie-indicatie uit claudicatio intermittens (Fontaine II). Er bleven 307 patiënten voor analyse over, bij wie 71 occlusies optraden; deze occlusies werden verdeeld in direct postoperatieve occlusies en occlusies tot één jaar. In de ASA-groep kwam postoperatief in 2.8% en in de placebogroep in 5.1% reocclusie voor; de percentages na één jaar bedroegen respectievelijk 11.2 en 22 (statistisch significant).

Bollinger et al. vervolgden prospectief 120 patiënten na een femoropopliteale endarteriectomie. Randomisatie werd uitgevoerd voor drie schema's: ASA 1000 mg/dag, een combinatie van ASA 1000 mg/dag en dipyramidol 225 mg/dag en tenslotte coumadine. Op geleide van de prothrombinetijd werden de anticoagulantia door de huisarts gedoseerd, met een gemiddelde waarde van 34%. Na twee jaar bedroeg de cumulatieve doorgankelijkheid voor deze groepen respectievelijk 84%, 76% en 58%, waarbij het verschil tussen de ASA-groepen en de coumadinegroep significant was. De auteurs stelden, dat de doorgankelijkheid werd beïnvloed door de lengte van de desobstructie en het type operatie en dat de doorgankelijkheid meer afnam na een halfgesloten procedure (gemiddelde lengte 25.8 cm) dan na een open desobstructie (gemiddelde lengte 10.3 cm). Het verschil tussen de ASA-groepen en coumadinegroep is mogelijk te verklaren door enerzijds de te

laag ingestelde antistolling en anderzijds door de frequenter uitgevoerde desobstructie over een lang traject, namelijk in de ASA-groepen 25% en in de coumadinegroep 46%.

Om re-stenosering te voorkomen, wordt thrombusremming ook na transluminale coronairangioplastieken zinvol geacht. In vergelijking tot coumarine, blijkt ASA in een dosis van 325 mg/dag effectiever in de preventie van recidief stenosen bij patiënten met een langer dan 6 maanden bestaande angina pectoris (Thornton et al. - 1984).

Aangezien de capaciteit en de perifere weerstand van het distale vaatbed niet kunnen worden beïnvloed, kan samenvattend worden gesteld, dat het bij vaatreconstructies zinvol is om de effecten van plaatjesremmers en anticoagulantia op de thromboseering vast te stellen.

Argumenten om het effect van voornoemde middelen via het aortaflapmodel vast te stellen worden primair gevonden in de gelijkenis van het model en de veelal door omstandigheden beperkte vaatchirurgische techniek. Deze omstandigheden zijn slechts optimaal in geval van bijvoorbeeld plastieken met een end-to-end everterende anastomose, afwezigheid van stenosen, prothesen met een naar distaal toe afnemend lumen en een optimale bloedstroom, gebruik van autoloog materiaal en aanwezigheid van normaal functionerend endotheel. Vaak blijkt de techniek negatief beïnvloed te worden door bijvoorbeeld gebruik van end-to-side anastomosen (waardoor hoeken gecreëerd worden met haemodynamische consequenties), verschillen in kaliber en compliance tussen prothese en acceptor-arterie, aanwezigheid van arteriosclerotische plaques, bloedstroombemmering (in- en uitstroom), expositie van de thrombogene media en het ontstaan van een intima"richel" na endarteriectomie.

Juist deze negatieve omstandigheden worden in het aortaflapmodel teruggevonden, waardoor het voldoet aan de experimenteel vereiste intrinsieke consequenties van een vaatchirurgische reconstructie.

In het aortaflapmodel passen de factoren, die van belang zijn voor het ontstaan van een thrombus, in de theorie van Virchow.

Deze factoren zijn:

1. Veranderingen in de haemodynamiek.

Dit model veroorzaakt, evenals een arteriële vaatnaad, haemodynamische veranderingen ten gevolge van een acute vernauwing op basis van de zich in het lumen bevindende flap. Ten gevolge van de verhoogde bloedstroomsnelheid langs de aldus ontstane stenose ontstaat een toeneming van de "shear stress". Ter plaatse van de flap komt de bloedstroom in contact met thrombogene subendotheliale structuren (zoals de adventitia), terwijl aan het einde van de flap een abrupte verwijding kan optreden, waardoor divergentie van de bloedstroom optreedt met als gevolg een "doodwaterzone" met turbulentie en stase.

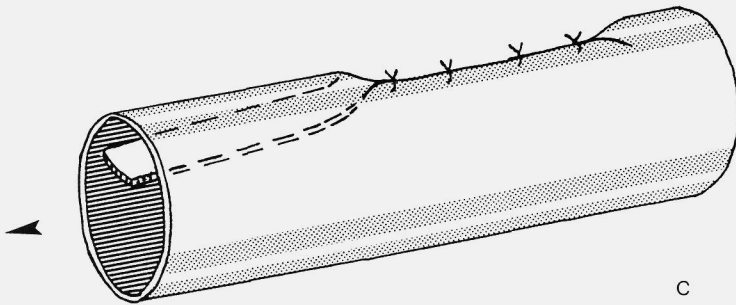
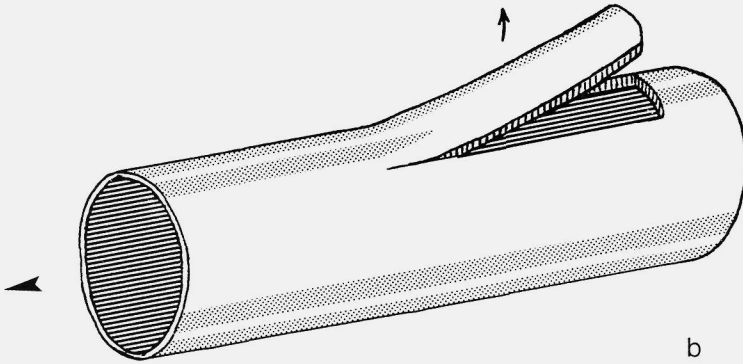
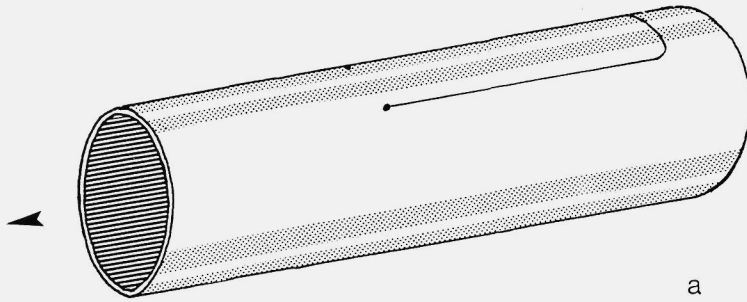
2. Het vrijkomen van weefselthromboplastines.

Zoals ook bij een arteriotomie, wordt in het aortaflapmodel de gehele vaatwand doorsneden en komen weefselthromboplastines langdurig met de bloedstroom in contact. Dit, in tegenstelling tot vele andere arteriële thrombosemodellen, waarin òf alleen subendotheliale weefsel in contact wordt gebracht met de bloedstroom, òf vreemd materiaal (zoals hechtmateriaal, catheters en shunts) wordt ingebracht, waarmee de humane situatie in feite minder goed wordt benaderd.

3. Dit model beïnvloedt tevens de locale samenstelling van het bloed door stollings- en plaatjesactivatie.

Verse humane thrombi (verkregen na embolectomie en endarteriectomie, uit geoccludeerd bypassmateriaal en atherosclerotische coronairarteriën) vertonen histologisch dezelfde kenmerken als de thrombi in het aortaflapmodel (Van Aken et al. - 1982). Histologisch onderzoek van de 24-uurs thrombi liet een uit plaatjes en fibrine samengestelde thrombus zien, waarin polymorfonucleaire leucocyten voorkomen, terwijl op het thrombusoppervlak nieuwe plaatjesappositie en -aggregatie werd aangetroffen. Deze samenstelling is gelijk aan die van wat oudere thrombi. In de vroege fase komt de flapinductie derhalve overeen met een (experimenteel vereiste) niet optimaal uitgevoerde arteriële anastomose.

Resumerend kan worden gesteld, dat de invloed van plaatjesremmers en anticoagulantia op thromboseering dient te worden vastgesteld op basis van de met het aortaflapmodel verkregen resultaten. Aansluitend kunnen klinische gegevens over het effect van deze middelen na de verschillende vaatreconstructies worden verkregen en kan gekomen worden tot een juiste keuze en een juiste dosering met zo min mogelijk bijwerkingen.



Figuur 6 - De aortaflapprocedure.

5.1 - OPERATIE EN MICROCHIRURGISCHE METHODE

Thrombose-inductie werd uitgevoerd volgens de aortaflap-procedure, ontwikkeld door Van Aken (thesis 1982).

Bij deze procedure werden mannelijke Wistar-ratten (Centraal Proefdierbedrijf, TNO, Zeist) met een gewicht van 200 tot 250 gram gebruikt. De operatie werd onder algehele anaesthesie uitgevoerd, na een intraperitoneale injectie met Nembutal^R in een dosering van 60 mg/kg.

Via een mediane laparotomie werd het abdomen geopend en het darmpakket in een vochtig gaas terzijde gelegd, en werden het distale deel van het colon descendens en het sigmoïd in situ gelaten. Het retroperitoneum werd door stomp prepareren geopend en de aorta werd vanaf ruim boven de aa. renales tot op de aortabifurcatie vrijgelegd.

Voor het maken van de flap werd gebruik gemaakt van een Zeiss Opmi I operatiemicroscop met tienvoudige vergroting, microchirurgisch instrumentarium van Aesculap en 10/0 Dermalon hechtmateriaal met een C₄-naald (Davis en Geck). Met behulp van twee microchirurgische forceps werd de aorta vrijgeprepareerd van de vena cava inferior. De adventitia werd voorzichtig van de aorta afgeschoven, zonder de vena cava met de forceps te pakken omdat dit een grote kans op verscheuring van het fragiele vat en een bijna onafwendbare verbloeding van het dier tot gevolg zou hebben.

Twee microvasculaire klemmetjes (Aesculap microclips, 20-30 gram/mm²) werden op een afstand van 5 tot 10 m.m op de aorta geplaatst. Vervolgens werd de aorta iets links van de mediaanlijn over een afstand van 2 mm in de lengterichting geopend (zie fig. 6). Aansluitend werd een parallelincisie gelegd op een afstand van circa 0.5 mm rechts van de voorgaande incisie, zodat een distaal aan de vaatwand vastzittende flap ontstond.

Deze aortaflap bestaat uit de drie oorspronkelijke lagen van de vaatwand (intima, media en resten adventitia) en wordt totaal omgeklapt naar distaal in het lumen gebracht.

De arteriotomie wordt met 4 tot 6 staande hechtingen everterend gesloten, zonder veel vernauwing van de diameter van het vat teweeg te brengen. Nadat de microklemmen zijn afgenomen, wordt de flap door de bloedstroom

naar distaal omgeklapt gehouden. Na controle op haemostase wordt het darmpakket teruggelegd en het abdomen gesloten. De kleur van de achterpoten is een directe indicator voor de doorgankelijkheid van het vaattraject.

5.2 - PROTOCOL

Van elk geopereerd dier werd een protocol (zie figuur 7) bijgehouden en werden alle relevante gegevens geregistreerd: het gewicht van de rat, de tijdsduur van de ingreep, de hoeveelheid toegediend Nembutal^R voor anaesthesie, de bijzonderheden van de ingreep (zoals bijvoorbeeld vernauwing van het vat, bijzonderheden van de flap), het (geschatte) bloedverlies, de respiratie en de kleur van de achterpoten na afname van de klemmen. Tevens vond registratie plaats van gegevens over het opofferen, de perfusie en de fixatie en het uitprepareren van de aorta alsmede de gegevens betreffende de histologische (voor)bewerking.

5.3 - METHODE VAN OPOFFERING, PERFUSIE-FIXATIE EN INBEDDING

Alle dieren werden onder algehele anaesthesie (Nembutal^R 60 mg/kg lichaamsgewicht) opgeofferd. Hierbij werd het abdomen via de oude incisie geopend en de aorta op de reeds beschreven wijze vrijgelegd. Aansluitend werd de thorax met een schaar geopend en werd de linker ventrikel van het hart gepuncteerd.

Na openen van de aorta ter plaatse van de bifurcatie, vond perfusie plaats via de hartcanule onder een druk van 130 cm H₂O met 4% para-formaldehyde in een 0.1 M fosfaatbuffer (pH=7.4), tot de perfusievloeistof helder geworden was. Vervolgens vond perfusie plaats met 1.5% glutardialdehyde in dezelfde buffer, waarna de infrarenale aorta werd uitgeprepareerd en in oorspronkelijke lengte op een teflon bodem werd opgeprikt. Nafixatie vond minimaal gedurende 24 uur plaats in glutardialdehyde.

Epon-inbedding

De aorta's werden watervrij gemaakt door middel van het doorvoeren via een alcoholreeks in opklimmende concentratie van 70 tot 100% naar propyleenoxide en werden volgens schema ingebed in een Epon-oplossing.

Figuur 7

PROEFDIERPROTOCOL

Datum operatie :-.....-.....

Tijd : min.

Rat nr. :

Gewicht : gram

Anaesthesie : cc Nembutal^R

Operatie : bijzonderheden flap :
bloedverlies :
respiratie :
kleur achterpoten :
hechtmateriaal :
complicaties :
bijzonderheden :
duur ingreep :

Datum opoffering :-.....-.....

Tijd tussen operatie en opoffering : uur

Bijzonderheden bij : uitprepareren :
perfusie en fixatie :
inbedding :
kleuring :

Samenvatting :

Dit schema bestond uit:

1. 15 minuten in alcohol 70%
2. 15 minuten in alcohol 96%
3. 3x15 minuten in alcohol 100%
4. 3x15 minuten in propyleenoxide
5. 2x45 minuten in propyleenoxide/Epon A+B* (1:1)

* Epon A+B = 3 delen A + 7 delen B + DMP 30

- Epon A: 184.8 gram DDSA (Dodexenyl Succinic Anhydride) + 139.2 gram Epon 812
- Epon B: 341.2 gram MNA (Methyl Nadic Anhydride) + 382.5 gram Epon 812
- DMP 30: 2.4.6-tri (dimethylaminomethyl) phenol; 1.5 gram DMP 30 per 100 gram Epon A+B

De aorta's werden op een voorgepolymeriseerde Epon-bodem opgeprikt en in een bakje met de Epon-oplossing afgevuld, waarna uitharding plaatsvond in een stoof gedurende 24 uur bij een temperatuur van 40°. Deze procedure werd voor elke nieuwe laag vaten herhaald, zodat een blokje Epon werd verkregen met drie lagen aorta's.

5.4 - SNIJPROCEDURE

De in Epon ingebedde aorta's werden volledig dwars opgesneden, waarbij elke te meten coupe 4 μm dik was. Tussen de te meten coupes werd een afstand van 175 μm aangehouden.

De microscoopglasjes werden gecoat met een chromaluin-gelatinemengsel (0.75% gelatine, 0.075% chromaluin, 0.01% thymol), waarna de coupes werden opgebracht.

Vervolgens werd de Epon uit de coupes verwijderd door middel van doorvoering in een verzadigde oplossing van NaOH in alcohol 100% en werden de coupes via een afnemende alcoholreeks naar aqua dest. gebracht.

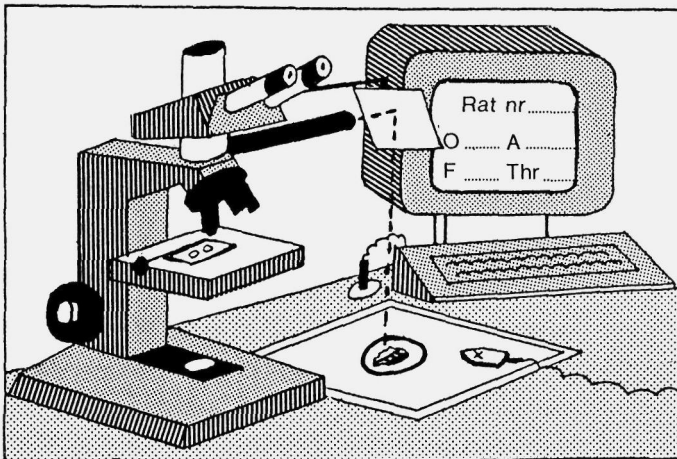
5.5 - KLEURING

Kleuring vond plaats volgens de Lawson-Martius-scarlet-blue-procedure. Deze kleuringsmethode (Lindeman - 1976) is een combinatie van Lawson's elastica kleuring en de MSB-kleuring volgens Lendrum (1962).

5.6 - MORFOMETRIE

Van elke aorta werden morfometrische oppervlaktemetingen uitgevoerd. Van de dwarsdoorsneden van de vaten, werden de oppervlakte van het vaatlumen, de flap (intima en media), de adventitia en de thrombus op de vaatnaad en op de flap gemeten.

Door vermenigvuldiging van de oppervlakte met de afstand ($175 \mu\text{m}$) tussen de coupes onderling werd een volume berekend; tevens werd de lengte van de flap vastgesteld. De metingen werden verricht met een Manual Picture Analysis System (MOP-Kontron AG, Zürich, Zwitserland) (zie figuur 8), waarbij het coupe-beeld werd geprojecteerd via een Nikon-Optiphot microscoop op een X-Y-tablet. Deze instrumentatie bestaat uit drie basiscomponenten: een electromagnetische gevoelige plaat, een cursor die electronisch verbonden is met een geheugen (IBAS-I interactive image analysis system), en een computer. Indien de cursor wordt geactiveerd, wordt de positie ervan op de plaat vastgelegd, afhankelijk van de X-Y-coördinaten.



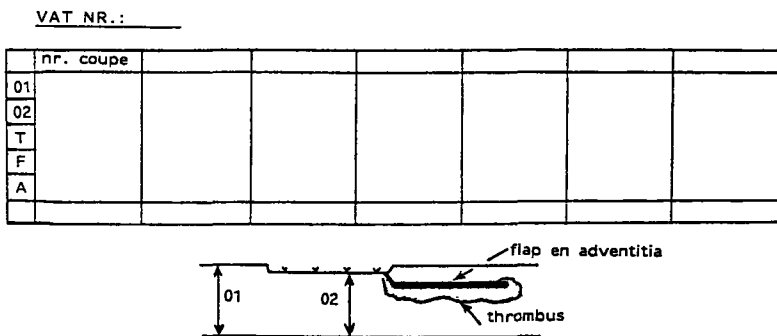
Figuur 8 - Opstelling van het Manual Picture Analysis System.

Door projectie van het rode lichtpunt van de cursor in het oculair beeld van de microscoop kan een lijn om het te meten object worden getrokken

en de oppervlakte worden gemeten. Via een beeldscherm wordt de oppervlakte na calibratie digitaal uitgedrukt in μm^2 . Theoretische overwegingen kunnen worden gevonden in "A manual of morphometry in diagnostic pathology" (J.P.A. Baak en J. Oort, 1983). De gemeten oppervlakten, lengten en berekende volumina werden op uitslagenformulieren (zie figuur 9 en 10) geregistreerd. Vervolgens werden de resultaten van de verschillende behandelingsgroepen met hun controles gegroepeerd. De microscopische beelden werden getekend (voor een voorbeeld hiervan wordt verwezen naar figuur 13), waaronder met name de positie van flap en thrombus in het vaatlumen. Tevens vond registratie plaats van onder meer de positie van de flap ten opzichte van de vaatwand, de plaats van de vaatnaad, het geschatte oppervlaktepercentage thrombus en de aanwezigheid van voornoemde structuren in de genummerde coupes.

Aldus kon niet alleen een morfologisch overzicht, maar tevens een overzicht in maat en getal van het geopereerde vat met de flap worden gegeven.

Op basis van de in het operatieprotocol vermelde macroscopische bijzonderheden (zoals bijvoorbeeld een vernauwing ter plaatse van de naad, een relatief te breed of te lang geknipte flap, het geschatte bloedverlies, de kleur van de achterpoten na afname van de klemmen e.d.), werd naar een correlatie gezocht tussen peri-operatieve bijzonderheden, microscopische resultaten en uitval.



Figuur 9 - Registratieformulier en schematische lengtedoorsnede van het vat met de flap, waarbij O1 de oppervlakte van het vaatlumen proximaal en O2 ter plaatse van de arteriële naad weergeeft.

RAT NR. TOTAAL METINGEN

	LENGTE		THROMBUS
NAAD			
	lengte	volume	
FLAP			
	lengte	volume	
ADVENTITIA			
STAART			

Figuur 10 - Registratieformulier voor de weergave van het totaaloverzicht van de metingen per proefdier.

5.7 - DOSERING

- Acetylsalicylaat:

De doseringskeuze van 2.5 en 5 mg/kg/dag/p.o. berust op de experimentele gegevens over remming van plaatjesactiviteit enerzijds en sparen van de prostacyclineproductie anderzijds. In ratten bedraagt de 50% remmende dosis voor plaatjes 3.6 mg/kg/dag/i.p. en voor de arteriële prostacyclineproductie 25 mg/kg/dag/i.p. Bij de mens geeft een dagelijkse orale dosis van 30 mg ASA, gedurende minimaal een week gegeven, meer dan 90% remming van de thromboxaanproductie, zonder dat de prostacyclinesynthese, gemeten aan de excretie van 6-keto-prostaglandine-F1 α in de urine wordt beïnvloed (Kallman et al. - 1987).

- Ticlopidine:

De doseringskeuze van 10 en 30 mg/kg/dag/p.o. is gebaseerd op de resultaten van enkele experimentele studies bij de rat (Ashida et al. - 1980, Van Aken - 1982, Pumphrey et al. - 1982). In een kleine

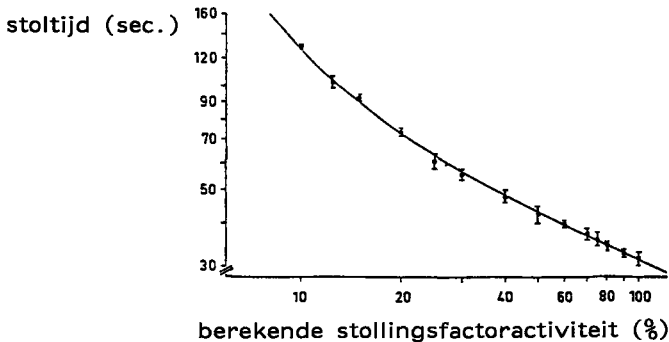
serie van met ticlopidine 100 mg/kg/dag/p.o. behandelde ratten werd in het aortaflapmodel een gemiddelde afneming van het thrombusvolume vastgesteld van circa 60% (Van Aken - 1982). Bij de mens wordt met ticlopidine 125 mg/dag/p.o. na enkele dagen een remming van 50% bereikt voor de ADP-geïnduceerde plaatjesaggregatie (Panak et al. - 1983).

- Warfarine:

De dosering van warfarine vond plaats op geleide van de normotest, waarbij een therapeutische waarde van 110 tot 120 seconden werd nagestreefd. In tegenstelling tot de thrombotest bij de mens, bleek de normotest bij de rat het meest geschikt om de stollingsactiviteit te meten. Figuur 11 toont de bij de normotest behorende curve voor de rat, waarbij de stoltijd is uitgezet tegen de berekende stollingsfactoractiviteit (Van Oosterom et al. - 1974).

- t-PA:

De doseringskeuze van 6750 en 45000 IU/kg/i.v. berust respectievelijk op de in vitro clot lysis tijden en op de effectiviteit van deze doseringen in experimentele thrombosemodellen (Emeis - 1988).



Figuur 11 - (uit: Specialia, "Control of anticoagulation in rats" van A.T. van Oosterom et al.)

5.8 - BEHANDELINGSSCHEMA'S

De operatie werd uitgevoerd bij groepen van zes ratten per dag; in deze groepen kwamen zowel behandelde als controledieren voor, zonder dat de operateur op de hoogte was van het op de rat toegepaste behandelings-

schema. Deze schema's waren tevoren door middel van een tabel aselechte getallen bepaald.

Hieronder volgt een beschrijving van de behandelingsschema's.

Beschrijving acetylsalicylaatseries

In de ASA-series werd voor twee doseringen gekozen, namelijk 2.5 mg (n=8) en 5 mg/kg/dag/p.o. (n=10). In de controlegroep werden 8 ratten geopereerd.

In deze series werd het onderstaande behandelingsschema toegepast, waarbij een aantal haematologische bepalingen werd uitgevoerd (haematocriet, leucocytenaantal, thrombocytenaantal) en de normotest werd bepaald door middel van veneuze bloedafname uit één van de staartvenen.

Behandelingsschema ASA

- dag 1

behandelde groep : gewichtsbepaling (gr.)
normotest
haematocriet
leucocytentelling
thrombocytentelling

ASA oraal via knopsonde;

controlegroep : drinkwater via knopsonde

- dag 2 : ASA oraal of in drinkwater via knopsonde

- dag 3 : als dag 1, met aansluitend de flapoperatie

- dag 4 : als dag 1; 24 uur postoperatief opofferen door perfusie-fixatie en uitprepareren van de aorta

Beschrijving ticlopidineseries

In de ticlopidineseries werd voor twee doseringen gekozen, namelijk 10 mg (n=15) en 30 mg/kg/dag/p.o. (n=13). In de controlegroep werden 14 ratten geopereerd. In deze series werden dezelfde haematologische bepalingen uitgevoerd als in de ASA-serie.

Behandelingschema ticlopidine

- dag 1

behandelde groep : gewichtsbepaling
normotest
haematocriet
leucocytentelling
thrombocytentelling

toediening van resp. 10 en 30 mg ticlopidine/kg/dag, opgelost in 0.5% Tween 80 in aqua dest. per knopsonde

controlegroep : 0.5% Tween 80 in aqua dest.

- dag 2 : ticlopidine of 0.5% Tween 80 in aqua dest.

- dag 3 : als dag 1, met aansluitend de flapoperatie

- dag 4 : als dag 1; 24 uur postoperatief opofferen door middel van perfusie-fixatie en uitprepareren van de aorta

Beschrijving wafarineserie

In de warfarineserie werden 13 ratten behandeld, die dagelijks 130 µg warfarine in 15 ml drinkwater kregen toegediend.

Overdag vond haematologisch onderzoek plaats identiek aan de twee vorennoemde groepen.

Tevens werd de normotest bepaald; in tabel 5 zijn de verschillende normotestwaarden op dag 2, 3 (operatiedag) en 4 (opofferingsdag) vermeld. Tijdens operatie bedroeg de normotest gemiddeld 119±30 seconden.

Behandelingschema warfarine

- dag 1
 - behandelde groep : gewichtsbepaling
haematocriet
leucocytentelling
thrombocytentelling
 - warfarine in drinkwater
 - controlegroep : drinkwater via knopsonde
 - dag 2 : normotest
behandelde groep: warfarine in drinkwater
controlegroep: drinkwater
 - dag 3 : als dag 1, met normotest en aansluitend de flapoperatie
 - dag 4 : als dag 1, met normotest; 24 uur postoperatief opofferen door perfusie-fixatie en uitprepareren van de aorta
-

Plasmabepalingen

In zes aparte series van 5 niet-geopereerde ratten per farmacon (ASA 2.5 en 5.0 mg/kg/dag/p.o., ticlopidine 10 en 30 mg/kg/dag/p.o., warfarine en controles) werden op dag 3 plasmabepalingen verricht op fibrinogeen, plasminogeen en plasminogeenactivatorremmer (PA-I). De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 7.

Beschrijving weefseltype-plasminogeenactivator-serie

In totaal werden 39 ratten behandeld met t-PA en dienden 24 ratten als controle. De behandelde ratten werden verdeeld in twee groepen:

- De eerste groep kreeg de activator direct postoperatief in een lage dosis (6750 IU/kg/i.v.) gedurende een half uur toegediend.
- In de tweede groep werd de activator 24 uur postoperatief in twee

doseringen (6750 en 45000 IU/kg/i.v.) toegediend, eveneens gedurende een half uur. Ook in deze groep vond toewijzing plaats aan de hand van aselechte getallen.

Bij de controlegroepen tezamen (n=24) werd fysiologisch zout in eenzelfde volume als de activator toegediend.

Infusie van t-PA vond plaats via de Harvard-infusion/withdrawal pump, door canulatie van de v. dorsalis penis. Gedurende de initiële 3 seconden werd een oplaaddosis t-PA van 0.4 ml gegeven; tijdens de resterende 30 minuten werd 2.6 ml gegeven, waarna het dier werd geperfundeerd en opgeofferd.

In een aparte serie van 5 niet-geopereerde ratten werden vóór en aan het einde van de t-PA infusie de haematocriet en de plasmaparameters (fibrinogeen, plasminogeen, t-PA activiteit en plasminogeenactivatorremmer) bepaald, die in tabel 8 zijn vermeld.

Behandelingsschema t-PA

groepsindeling c.q. behandelingsschema	aantal geopereerde ratten
- <u>groep 1/6750 IU/kg</u> 0 ___ t-PA ___ ½ uur: opoffering	15
- <u>controles groep 1/fys.zout</u> 0 ___ fys.zout ___ ½ uur: opoffering	7
- <u>groep 2/6750 IU/kg</u> 0 ___ ---- ___ 24 ___ t-PA ___ 24½ uur: opoffering	14
- <u>groep 3/45000 IU/kg</u> 0 ___ ---- ___ 24 ___ t-PA ___ 24½ uur: opoffering	10
- <u>controles groep 2 en 3/fys.zout</u> 0 ___ ---- ___ 24 ___ fys.zout ___ 24½ uur: opoffering	17
- totaal	<u>63</u>

Overzicht uitval

	n	serie
<u>macroscopisch ongeschikt:</u>		
. verbloeding na operatie	2	warfarine
. ademstilstand	1	t-PA
. peritonitis	1	ticlopidine 10
. darmruptuur	1	ASA 5
. vena cava ruptuur	1	controle
. operatieve fout	<u>1</u>	warfarine
	7 (4.9%)	
<u>microscopisch ongeschikt:</u>		
	8	t-PA
	5	controle
	1	ASA 5
	1	ticlopidine 30
	<u>1</u>	warfarine
	16 (11.1%)	
totaal	<u>23</u> (16%)	

De directe postoperatieve mortaliteit bedroeg 3 van de 144 ratten (2.1%).

- In de ASA- en ticlopidineseries trad geen per- of postoperatief excessief of langdurig bloedverlies op. In de ASA 5-serie werd 1 rat voor analyse uitgesloten wegens een peroperatief opgetreden accidentele darmruptuur; in de ticlopidine 10-serie werd 1 rat uitgesloten wegens een peritonitis.

- In de warfarineserie overleden 2 van de 13 ratten binnen 24 uur na operatie ten gevolge van een naadbloeding. Voor deze beide dieren bedroeg de normotest tijdens operatie 1.30 minuten, zodat de antistolling niet als "doorgesloten" kon worden aangemerkt. Bij 5 van de 11 resterende dieren werd een peri-aortaal haematoom vastgesteld. In deze serie werd 1 rat uitgesloten wegens het foutief aanleggen van de flap.

- In de t-PA-serie overleed geen van de dieren ten gevolge van verbloeding. Op basis van een ademstilstand werd 1 rat uitgesloten.

- In de controleseries werd 1 rat uitgesloten op basis bloedverlies ten gevolge van een vena cava ruptuur.

Samenvattend werden 7 aorta's uitgesloten op basis van macroscopische criteria (4.9%). Ten gevolge van onvolledigheden in de inbeddings- en afwerkingsprocedures werden 16 aorta's uitgesloten voor microscopie (11.1%).

5.10 - HISTOLOGIE

Histologische bevindingen

Alle 121 aorta's werden histologisch onderzocht na bewerking volgens de reeds beschreven methoden. Bij 120 ratten werd een thrombus op de flap aangetroffen, die zich in 113 gevallen naar proximaal over de naad uitstrekte, terwijl in geen der gevallen sprake was van reactie op het gebruikte hechtmateriaal. In het algemeen bestond de thrombus zowel direct als na 24 uur uit een gelaagd opgebouwde plaatjes-fibrinemassa met daarin verspreid erythrocyten en wat polymorphonucleaire leucocyten.

Om een indruk te krijgen omtrent de histologische verschillen tussen de diverse (ASA, ticlopidine, warfarine, t-PA en controle) groepen, werden uit elke groep aselekt 5 ratten genomen. De microscopische preparaten van deze 20 aorta's werden histologisch beoordeeld zonder dat bekend was uit welke groep het preparaat afkomstig was.

De beschrijving van de thrombi omvatte een schatting van de hoeveelheid fibrine en de verdeling ervan in de thrombus, hetgeen werd weergegeven als "afwezig", "(zeer) weinig" of "veel", "grofvlokkig" of "fijnradig" fibrine, "gelocaliseerd" of "verspreid" in de thrombus aanwezig. De thrombocytenaggregaten werden weergegeven als "(zeer)brede band", "smalle band" of "afwezig" (zie tabel 3). Deze beschrijving werd mede beoordeeld door Dr. J.W. Steffelaar, patholoog-anatoom, Ziekenhuis Leyenburg te 's-Gravenhage.

In deze -weliswaar kleine- groepen blijkt na koppeling van de histologische beschrijving aan de (gecodeerde) herkomst van de preparaten:

- Het thrombocytenaggregaat in de met ASA en warfarine behandelde groepen is steeds als smalle band aanwezig, in tegenstelling tot de brede

band in de met ticlopidine behandelde en de controlegroep en de zeer brede band in de direct met t-PA behandelde groep. In de na 24 uur met een lage en hoge dosis t-PA behandelde groepen was een in grootte sterk wisselend thrombocytenaggregaat aanwezig.

- Het fibrine in de controlegroepen is vrijwel steeds grofvlokkig en in grote hoeveelheden aanwezig. In de behandelde groepen wordt weinig tot zeer weinig fibrine waargenomen, voornamelijk tegen de zijkant van de flap gelocaliseerd. In de met ASA, warfarine en alle met t-PA behandelde groepen is het fibrine fijndradig van aspect.

Tabel 3 - Histologische beschrijving van de thrombi

<u>groep</u>		<u>thrombocytenaggr.</u>	<u>fibrine</u>
<u>controles</u>	1	brede band	veel, verspreid, grofvlokkig
	2	brede band	veel, verspreid, grofvlokkig, draden
	3	afwezig	afwezig
	4	smalle band	weinig, gelocaliseerd op zijkant flap en adventitia
	5	brede band	veel, gelocaliseerd, grofvlokkig
<u>ticlopidine</u>	1	brede band	weinig, gelocaliseerd op zijkant flap, grofvlokkig
	2	brede band	afwezig
	3	brede band	weinig, verspreid, grofvlokkig
	4	brede band	weinig, gelocaliseerd aan de zijkant, dradig
	5	brede band	weinig, gelocaliseerd aan de zijkant, dradig
<u>ASA</u>	1	smalle band	weinig, verspreid fijndradig
	2	smalle band	weinig, gelocaliseerd tegen adventitia
	3	smalle band	weinig, gelocaliseerd tegen adventitia, fijndradig
	4	smalle band	weinig, gelocaliseerd tegen adventitia, fijndradig
	5	smalle band	weinig, gelocaliseerd tegen adventitia, fijndradig
<u>warfarine</u>	1	smalle band	weinig, verspreid, fijndradig
	2	smalle band	afwezig
	3	smalle band	weinig, fijndradig aan zijkant flap
	4	smalle band	zeer weinig
	5	smalle band	zeer weinig, fijnvlokkig

Vervolg tabel 3

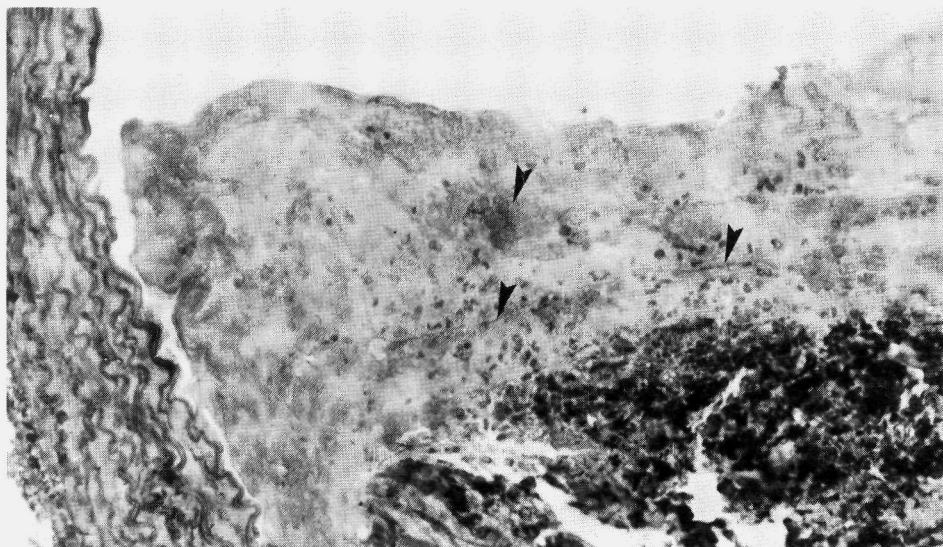
groep		thrombocytenaggr.	fibrine
<u>t-PA</u> <u>direct</u>	1	z.brede band	zeer weinig, fijndradig, lokaal
	2	z.brede band	zeer weinig, fijndradig, lokaal
	3	z.brede band	weinig, fijndradig, lokaal
	4	z.brede band	veel, vlokkig, verspreid
	5	z.brede band	afwezig
<u>controles</u> <u>direct</u>	1	brede band	veel, fijndradig, verspreid
	2	brede band	weinig, fijndradig, lokaal
	3	smalle band	veel, dradig-vlokkig, lokaal
	4	smalle band	veel, vlokkig, verspreid
	5	brede band	afwezig
<u>t-PA</u> <u>24 uur</u> <u>lage dosis</u>	1	smalle band	weinig, lokaal aan rand thrombus
	2	brede band	zeer weinig
	3	afwezig	afwezig
	4	smalle band	zeer weinig, fijndradig, lokaal
	5	smalle band	zeer weinig, fijndradig, lokaal
<u>t-PA</u> <u>24 uur</u> <u>hoge dosis</u>	1	brede band	zeer weinig, fijndradig, lokaal
	2	brede band	afwezig
	3	smalle band	weinig, fijndradig, lokaal
	4	z.brede band	zeer weinig, fijndradig
	5	smalle band	veel, fijndradig, verspreid

Op basis van de histologische bevindingen alleen, zou gesteld kunnen worden, dat het trombocytenaggregaat in de ASA- en warfarinegroepen kleiner is dan in de andere groepen en dat weinig fibrine aangetroffen wordt in de met ASA, warfarine en t-PA behandelde groepen.

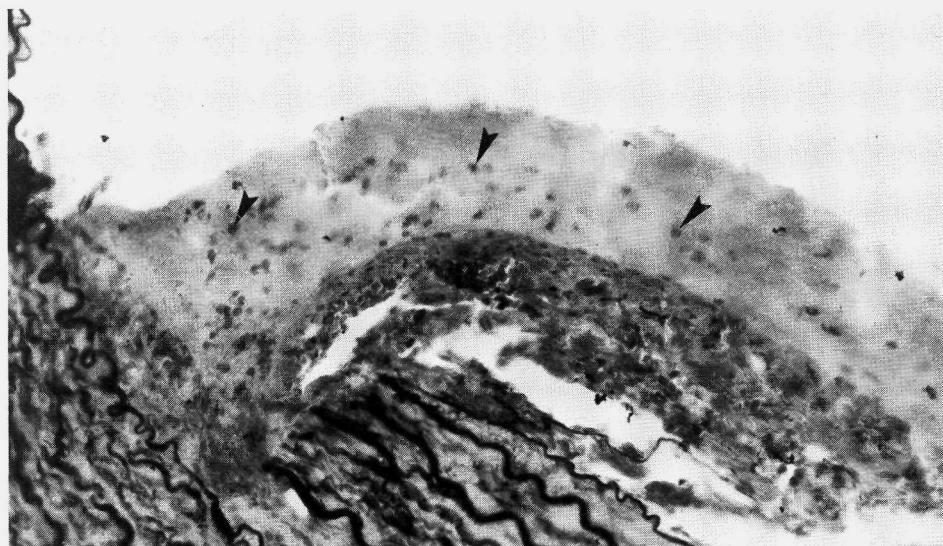
Ter illustratie is in figuur 12 een drietal coupes afgebeeld van respectievelijk een controledier, een met ASA en een met warfarine behandeld proefdier.

5.11 - VOORBEELD VAN DE BEWERKING VAN EEN PROEFDIER

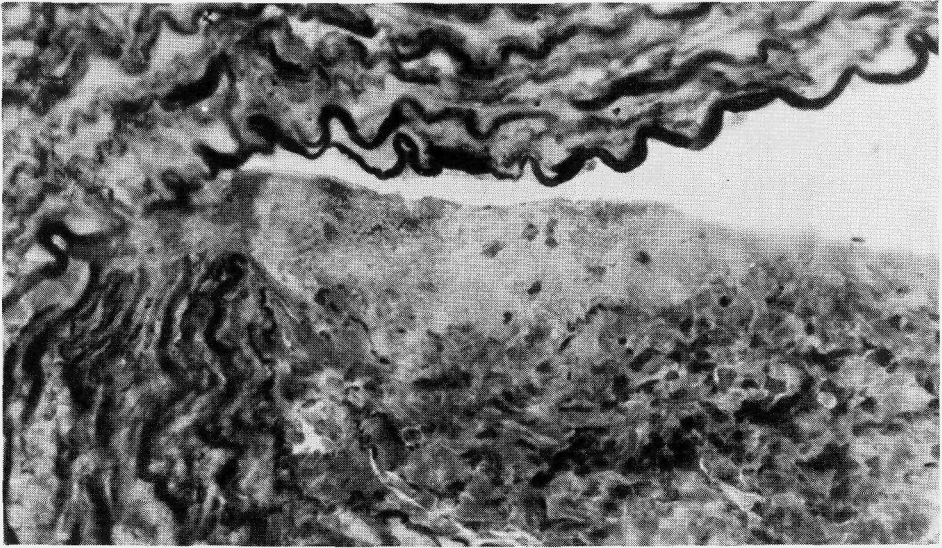
Aan de hand van één van de proefdieren (rat 148) uit de controlegroep van de plaatjesaggregatieremmers en warfarine worden hieronder de bewerking en de morfometrie vanuit het microscopisch beeld weergegeven. De foto's (vergrotingsfactor 100) en de tekeningen van een viertal coupes zijn afgebeeld in figuur 13.



Figuur 12A:
Thrombus op een flap van een controledier met gelocaliseerd fibrine (zie pijlen) (vergrotingsfactor 250).



Figuur 12B:
Thrombocytenaggregaat op een flap van een met ASA 2.5 mg/kg behandeld dier met verspreid leucocyten (zie pijlen) (vergrotingsfactor 250).



Figuur 12C:

Thrombocytenaggregaat op een flap van een met warfarine behandeld dier met zeer weinig fibrine (vergrotingsfactor 400).

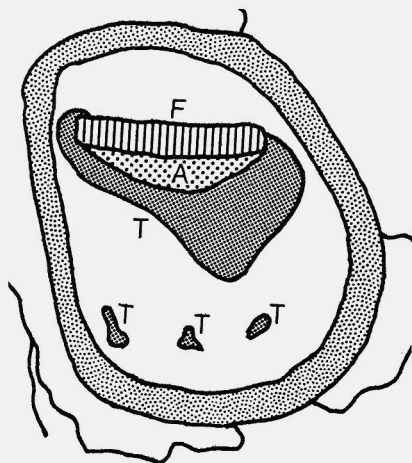
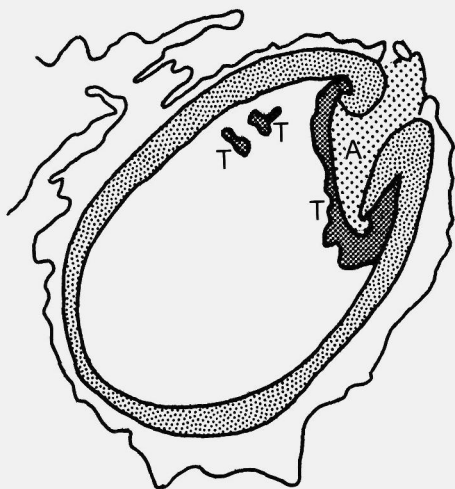
Tabel 4 - Oppervlakte meetgetallen van proefdier nr. 148

coupes nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11**
vaatlumen			484	454	461	469	483	483	zijtak	412	417
vat+naad	408	410									
thrombus		31	7	45	84	44	34	15	15	9	0
flap			34	33	45	62	27	32	38	17	0
adventitia		21	15	15	15	24	8	7	15	9	0

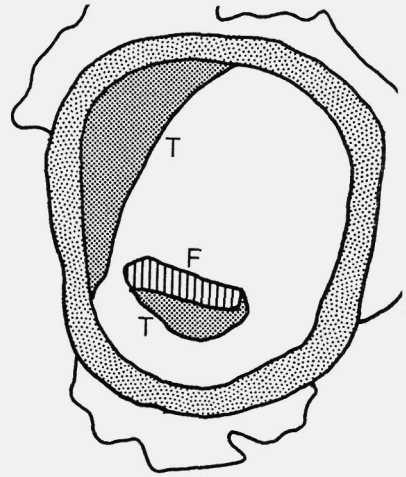
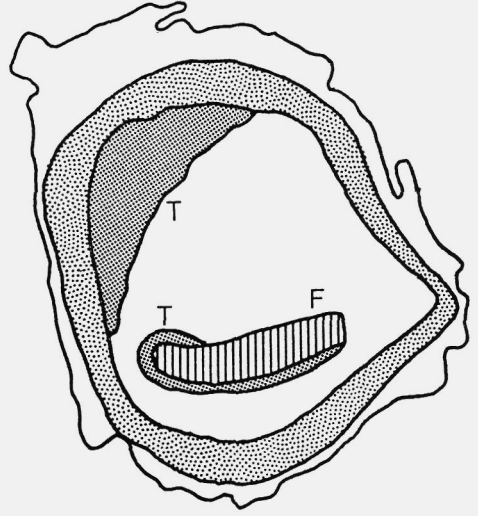
* oppervlakte in $\times 10^3 \mu\text{m}^2$
 ** coupe afstand: $175 \mu\text{m}$

Na berekening ziet het beeld van dit proefdier er als volgt uit:

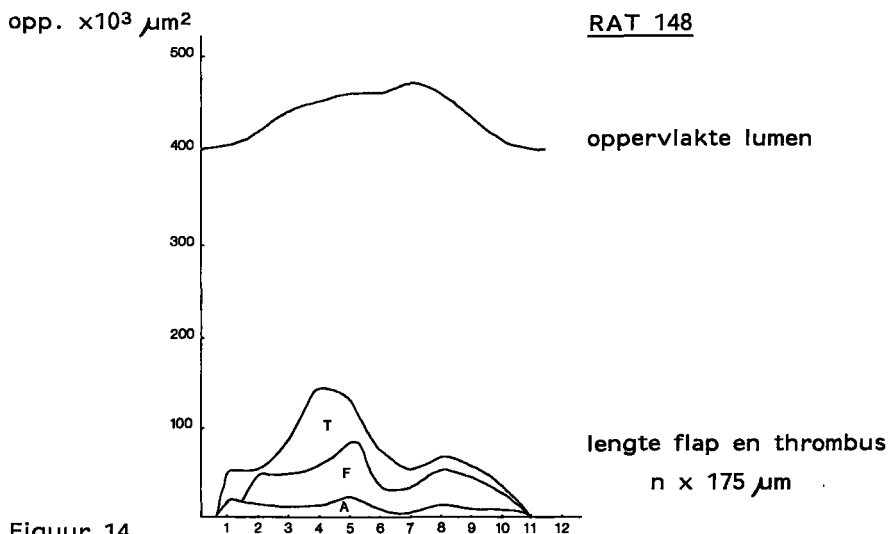
- lengte flap : $1575 \mu\text{m}$
- lengte adventitia : $1750 \mu\text{m}$
- volume thrombus op naad : $87 \times 10^5 \mu\text{m}^3$
- op flap : $440 \times 10^5 \mu\text{m}^3$
- volume flap : $501 \times 10^5 \mu\text{m}^3$
- volume adventitia : $224 \times 10^5 \mu\text{m}^3$



Figuur 13 - Microscopisch beeld van een flap (F), al dan niet met adventia (A) en een thrombus (T) van proefdier nr. 148.



In figuur 14 zijn de metingen grafisch weergegeven:



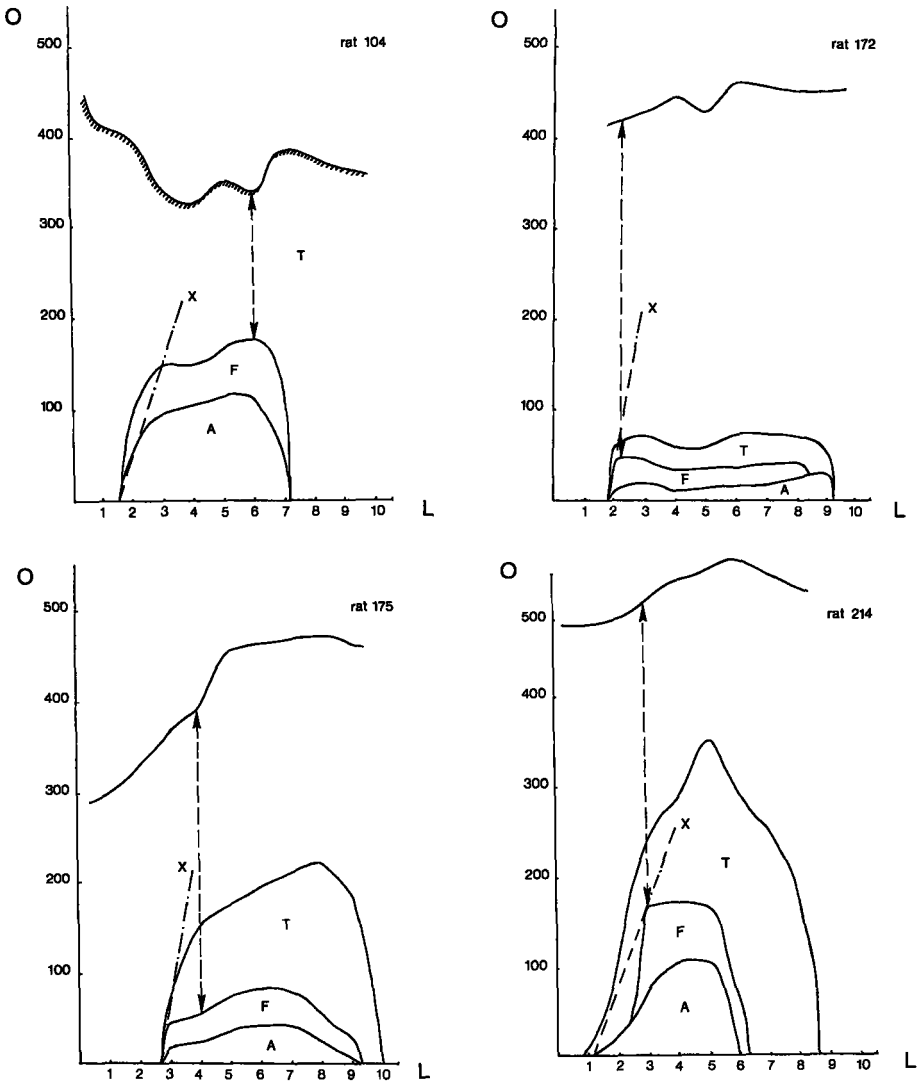
Ter illustratie zijn in figuur 15 vier grafische reconstructies van de flap, de adventitia en het thrombusoppervlak in relatie tot het vaatlumen van de proefdieren 104, 172, 175 en 214 afgebeeld, waarbij in elke reconstructie het minimale restoppervlak ter plaatse van een lumendoorsnede alsmede de proximale "helling" van flap plus adventitia worden aangegeven.

De proximale "helling" van flap plus adventitia is een maat voor de oppervlakteverandering per lengte-eenheid, met andere woorden: de snelheid waarmee stenoserings van het lumen door de flap (plus adventitia) optreedt, uitgedrukt in:

$$\frac{\text{oppervlak (in } \mu\text{m}^2\text{)}}{\text{lengte (in } \mu\text{m)}}$$

waarbij een helling van 1 een afname van het vaatlumen van $190 \mu\text{m}^2$ per μm representeert.

De hellingslijn wordt getrokken vanaf het begin van de flap, langs het punt waar de toename van het oppervlak per lengte-eenheid plotseling sterk afneemt.



Figuur 15 - Grafische reconstructie van metingen bij 4 proefdieren:

T = thrombus

F = flap

A = adventitia

X = hellingslijn

O = oppervlakte $\times 10^3 \mu\text{m}^2$

L = lengte flap en thrombus ($n \times 175 \mu\text{m}$)

HOOFDSTUK 6 - RESULTATEN

6.1 - NORMOTESTEN, HAEMATOLOGISCHE EN PLASMAPARAMETERS

Van de verschillende behandelde groepen zijn zowel de gemiddelde normotest (seconden) en de haematocriet (%) als het gemiddelde leucocytenaantal ($\times 10^5/\text{ml}$) en thrombocytenaantal ($\times 10^7/\text{ml}$) gegroepeerd in respectievelijk tabel 5 en 6. Van alle gemiddelde waarden is de standaarddeviatie vermeld. De plasmaparameters van de groepen apart geteste ratten zijn weergegeven in tabel 7 en de gegevens betreffende de t-PA-serie zijn gerangschikt in tabel 8.

Tabel 5 - Normotesten bij met warfarine behandelde dieren (sec) (n=9)

	<u>dag 2</u>	<u>dag 3</u> (operatie)	<u>dag 4</u> (opoffering)
rat nr.			
1	56	87	130
2	68	137	65
3	69	120	55
4	68	172	170
5	56	103	60
6	40	85	n.g.
7	37	90	145
8	110	140	n.g.
9	<u>115</u>	<u>135</u>	<u>195</u>
	69±27	119±30	117±57

n.g. = niet gestold

p < 0.005

n.s.

In de met warfarine behandelde groep bedroeg de normotest op de operatiedag (dag 3) gemiddeld 119±30 seconden en op de dag van opoffering (dag 4) gemiddeld 117±57 seconden (normaalwaarde 37 seconden). Van twee ratten (nr. 6 en 8) stonde het bloed niet, terwijl de normotest bij rat nr. 2, 3 en 5 laag was, respectievelijk 65, 55 en 60 seconden. Deze waarden komen overeen met een stollingsactiviteit van ongeveer 30% (Van Oosterom et al. - 1974). Er blijkt geen duidelijke relatie te bestaan tussen deze normotesten en de afname van het thrombusvolume op dag 4.

Tabel 6 - Normotestwaarden en haematologische parameters (gem.waarden)

	dag	controles	ASA 5	ticl.10	ticl.30	warfarine
normotest	1/2	38±2	36±2	37±2	39±2	69±27(*)
(sec)	3	37±2	36±1	37±2	38±3	119±30
	4	34±4	33±2	37±2	37±5	117±57
haematocriet	1/2	47±2	47±2	48±2	46±2	49±1(*)
(%)	3	47±3	46±3	49±2	46±2	48±1
	4	48±4	45±2	49±2	45±6	43±5
leucocyten	1/2	102±16	101±12	108±24	95±16	116±27(*)
(10 ⁵ /ml)	3	117±26	129±20	101±19	99±23	108±17
	4	120±39	93±18	121±34	106±31	103±21
thrombocyten	1/2	108±20	99±11	93±11	119±16	118±5(*)
(10 ⁷ /ml)	3	98±12	93±11	92±13	90±17	122±8
	4	91±9	95±18	93±8	97±20	78±9
n		<u>20</u>	<u>11</u>	<u>16</u>	<u>12</u>	<u>9</u>

(*) = meting verricht op dag 2

Voor de duidelijkheid zijn de standaarddeviaties in de tabel opgenomen. Er waren geen significante verschillen, behoudens in de warfarinegroep bij de normotest ($p < 0.05$), de haematocriet ($p < 0.005$) en het thrombocytenaantal ($p < 0.01$) (gepaarde t-toets).

De in tabel 7 en 8 vermelde plasmabepalingen werden in aparte series van 5 niet-geopereerde ratten op dag 3 verricht. In de behandelde groepen werd het effect van het medicament op de verschillende parameters nagegaan. Opvallend is, dat de t-PA-activiteit in het plasma bij de met een lage en vooral bij de met een hoge dosis t-PA behandelde dieren een toeneming laat zien, terwijl de plasminogeenactivator-inhibitor (PA-I) niet meer meetbaar is.

Tabel 7 - Plasmabepalingen in controle- en behandelde groepen op dag 3

	controle	ASA 2.5	ASA 5.0	ticl.10	ticl.30	warfarine
fibrinogeen (%)	100±14	111±16*	82±11*	99±11*	119±15*	91±17*
plasminogeen (%)	100±21	80±9*	109±18*	117±24*	120±21*	90±12*
PA-I (IU/ml)	5.8±0.9	6.4±0.9	5.9±1.2	6.0±1.3	7.1±1.4	5.5±1.0
normotest (sec)	38±1	37±2	36±3	37±1	34±3	107±31
haematocriet (%)	46±2	46±2	46±1	44±1	46±2	40±2

100% fibrinogeen = 2.5 mg/ml

* = % van controlegroep (gem. ± s.d.)

Tabel 8 - Plasmabepalingen vòòr en aan het einde van de infusie

	lage dosis t-PA (n=5)		hoge dosis t-PA (n=5)	
	vòòr	einde	vòòr	einde
fibrinogeen (%)	100±10	96±7*	100±21	92±9*
plasminogeen (%)	100±17	89±12*	100±12	84±16*
t-PA activiteit (IU/ml)	1.6±0.7	9.6±2.1	1.2±0.6	48.3±5.4
PA-I (IU/ml)	5.7±0.8	0	6.1±1.3	0
haematocriet (%)	46±2	42±3	45±1	43±2

* = % van de waarde voor infusie (gem. ± s.d.)

6.2 - BEREKENINGEN CONTROLEGROEP; BEREKENINGSMODELLEN

Van de 22 controledieren van de groepen plaatjesremmers en warfarine tezamen werden 19 dieren morfometrisch geanalyseerd. Bij 9 dieren bestond een volledig afsluitende thrombus (hetgeen gedefiniëerd wordt als een thrombus, die in tenminste één coupe het vaatlumen geheel afsluit) en bij 10 dieren een niet-afsluitende thrombus. In een aantal gevallen was het thrombusvolume in de dieren met een afsluitende thrombus zeer groot wegens het (vermoedelijk als gevolg van de vaatafsluiting) ontstaan van rode stasethrombi proximaal en distaal van de flap. Hierbij werd de thrombus vaak zelfs onmeetbaar groot door uitbreiding buiten het microscopisch onderzochte deel van de aorta. Ook in de controledieren met een niet-afsluitende thrombus bleek de spreiding in thrombusvolumina zeer groot, variërend van 172 tot $4258 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ (gemiddelde: $932 \times 10^5 \mu\text{m}^3$; mediaan: $522 \times 10^5 \mu\text{m}^3$).

Aangezien ook in de behandelde groepen een grote spreiding in thrombusvolumina bleek te bestaan was het aannemelijk, dat variaties in de microchirurgische methode van thrombusinductie verantwoordelijk waren voor de spreiding in thrombusvolume. Om deze reden werd een analyse van de morfometrische gegevens van de controlegroep uitgevoerd, opdat de mogelijke relatie tussen enerzijds het thrombusvolume en anderzijds de overige gemeten variabelen onderzocht kon worden.

Uitgaande van de hypothese, dat in dieren met een afsluitende thrombus een sterkere prikkel tot thrombusvorming aanwezig was dan in dieren met een niet-afsluitende thrombus, werden binnen de controlegroep eerst deze twee subgroepen vergeleken.

Hierbij vond vergelijking plaats van de volgende parameters (zie tabel 9):

- a. volume (flap plus adventitia)
- b. lengte (flap plus adventitia)
- c. ratio volume/lengte (flap plus adventitia)
- d. oppervlak aortalumen vòòr flap plus adventitia
- e. minimale oppervlak aortalumen in het gebied van flap plus adventitia
- f. proximale helling flap plus adventitia, als een maat voor de snelheid van lumenvernauwing als gevolg van de flapoperatie
- g. het product van a. en f.

Tabel 9 - Morfometrische gegevens controlegroep

parameter	dimensie	niet-afsluitende thrombi (n=10)	afsluitende thrombi (n=9)
a. volume flap plus adventitia	$10^5 \mu\text{m}^3$	gemiddelde 1022 mediaan 460 spreiding 205-3172	1864 1384 291-4107
b. lengte flap plus adventitia	$10^3 \mu\text{m}$	1.63 ± 1.19	1.61 ± 0.84
c. ratio volume/lengte	$10^2 \mu\text{m}^2$	5.66 ± 2.26	11.13 ± 4.15
d. oppervlak aorta lumen vòòr flap	$10^6 \mu\text{m}^2$	0.37 ± 0.30	0.38 ± 0.11
e. minimale aorta lumen bij flap	$10^6 \mu\text{m}^2$	0.31 ± 0.11	0.18 ± 0.04
f. prox. helling flap plus adventitia	(relatieve eenheden)	0.95 ± 0.56	2.67 ± 1.79
g. product van a. en f.		gemiddelde 879 mediaan 592 spreiding 107-3172	4619 3012 1384-17140

De vermelde waarden zijn gemiddelden \pm de standaarddeviatie.

Aangezien deze getallen niet normaal verdeeld waren, werden de parameters a (volume) en g (product van volume en helling) in deze groepen getoetst met de non-parametrische Mann-Whitney test. In deze groepen

bleek het volume van flap plus adventitia niet significant van elkaar te verschillen; het product van dit volume en de helling echter wel ($p < 0.01$). Van de overige parameters (getest met de Student's t-test) verschilden de lengte van flap plus adventitia en het aortalumenoppervlak vóór de flap niet significant tussen de groepen.

Wel bestond een significant verschil tussen:

- de ratio volume/lengte van de flap (parameter c) $p < 0.005$
- het minimale lumenoppervlak (parameter e) $p < 0.005$
- de proximale helling (parameter f) $p < 0.01$

Uit correlatieberekeningen bleek, dat lengte en volume van flap plus adventitia in beide groepen sterk positief gecorreleerd waren ($r = +0.961$ en $r = 0.839$, beide $p < 0.01$). Van de overige parameters bestond alleen in de groep niet-afsluitende thrombi een significante correlatie tussen de parameters proximale helling en aortaoppervlak ter plaatse van de flap ($r = +0.626$, $p < 0.05$).

Uit deze gegevens werd de volgende hypothese opgesteld: De vorming van een afsluitende thrombus in een geopereerde aorta wordt bevorderd door een plotselinge, snelle vernauwing van het vaatlumen (parameter f), in combinatie met een groot volume van flap plus adventitia (parameter a). Hierbij wordt de ernst van deze vernauwing niet alleen bepaald door de ligging van de flap in het lumen, maar ook door de "dikte" van flap plus adventitia (parameter c).

Om te kunnen beoordelen of en in hoeverre grootte en positie van flap plus adventitia in het vaatlumen tevens bepalend waren voor de grootte van de gevormde thrombus, werd het verband tussen thrombusgrootte enerzijds en de flap-parameters volume, proximale helling, en het product van volume en proximale helling anderzijds statistisch onderzocht. Hiertoe werden de meetgegevens van 14 dieren uit de controlegroep geanalyseerd, namelijk 10 dieren met een niet-afsluitende thrombus plus de 4 dieren uit de subgroep met een afsluitende thrombus, waarbij de thrombusgrootte nauwkeurig bepaald kon worden. Bij de overige 5 dieren uit deze subgroep was de thrombusgrootte te sterk bepaald door de ontstane proxi-

male en distale stasethrombi om te komen tot een nauwkeurige meting van de thrombus.

Met het thrombusvolume als afhankelijke variabele werden getest:

- de stapsgewijze regressie op volume, proximale helling en hun product
- de multiële lineaire regressie op dezelfde drie parameters

In de stapsgewijze regressie bleek het product (Pr) van flapvolume en proximale helling zeer significant ($p=0.0001$) gecorreleerd met het thrombusvolume ($r=0.976$). Toevoeging van de proximale helling gaf een significante ($p=0.0086$), zij het slechts geringe, verbetering van de correlatie ($r=0.987$). Toevoeging van het flapvolume gaf geen verdere verbetering.

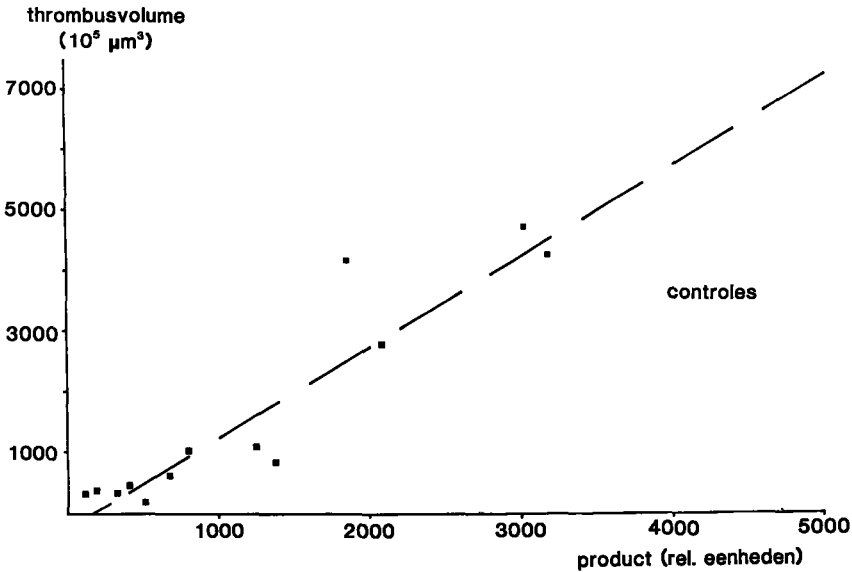
Bij de stapsgewijze regressie met flapvolume als eerste variabele was de regressie op het thrombusvolume significant ($p=0.0001$), echter minder goed ($r=0.778$) dan voor het product. Ook hier gaf toevoeging van de variabele proximale helling een significante ($p=0.002$), zij het geringe verbetering ($r=0.918$).

In het multiële lineaire regressiemodel bleek voor de drie variabelen proximale helling, flapvolume en product alleen het product significant gecorreleerd (respectievelijk $p=0.140$, 0.423 en 0.0001).

Uit deze berekeningen werd geconcludeerd, dat er een sterke correlatie bestaat tussen het thrombusvolume enerzijds en het product van het flapvolume en de proximale helling van de flap anderzijds ($p=0.0001$, $r=0.976$). Tevens werd geconcludeerd, dat dit product gebruikt kan worden als onafhankelijke variabele om het thrombusvolume in het gebruikte regressiemodel te voorspellen.

De regressievergelijking voor het berekenen van het thrombusvolume is in dit model: $1.551 \times (\text{proximale helling} \times \text{volume flap plus adventitia}) - 257$

De bij deze berekeningen gebruikte gegevens zijn weergegeven in tabel 9; figuur 16 toont de relatie tussen product en thrombusvolume.



Figuur 16 - Relatie product en thrombusvolume in de controlegroep.

6.3 - RESULTATEN VAN DE BEHANDELDE GROEPEN

Behandeling met aggregatieremmende middelen en antistolling

Het vóórkomen van afsluitende thrombi

Zoals is weergegeven in tabel 10, kwamen in de controlegroep van deze serie experimenten in 9 van de 19 dieren afsluitende thrombi voor (47%). In de met ASA, ticlopidine en warfarine behandelde groepen werden in 51 dieren slechts 6 afsluitende thrombi gezien (12%).

Tabel 10 - Het voorkomen van thrombi

groep	n	afsluitende thrombi	niet-afsluitende thrombi
ASA 2.5 mg	8	0	8
ASA 5 mg	8	1	7
ticlopidine 10 mg	14	3	11
ticlopidine 30 mg	12	2	10
warfarine	9	0	9
	<u>51</u>	<u>6</u>	<u>45</u>
controles	19	9	10

Vergelijking van de zes groepen met een χ^2 -test toont aan, dat tussen deze groepen een significant verschil bestaat in het aantal afsluitende thrombi ($\chi^2=12.77$; $df=5$, $p<0.05$). Indien de vijf behandelde groepen tezamen worden vergeleken met de controlegroep, dan is het verschil eveneens significant ($\chi^2=8.42$, $df=1$, $p<0.005$). Deze significantie geldt tevens in de vergelijking van de twee ASA-groepen tezamen ($\chi^2=9.34$, $df=1$, $p<0.005$) of de warfarinegroep ($\chi^2=4.29$, $df=1$, $p<0.025$) met de controlegroep, maar niet wanneer de met ticlopidine behandelde groepen tezamen of apart vergeleken worden met de controlegroep (respectievelijk $\chi^2=3.08$, $df=1$, $p>0.1$ en $\chi^2=1.88$, $df=2$).

Hoewel voor beide ticlopidinegroepen ten opzichte van de controlegroep geen statistisch significant verschil bestaat in het aantal afsluitende thrombi, laat een directe vergelijking van de getallen in tabel 10 zien, dat er op zich wel sprake is van een tendens naar het optreden van minder afsluitende thrombi in de met ticlopidine behandelde groepen.

Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden, dat behandeling met ASA of warfarine het optreden van afsluitende thrombi significant vermindert. Voorwaarde voor deze conclusie is echter, dat de thrombogene prikkel in de experimentele groepen niet geringer is dan die in de controlegroep.

De thrombogene prikkel in de ASA-, ticlopidine- en warfarinegroepen

In het voorgaande is uit de gegevens van de controlegroep geconcludeerd, dat de thrombusgrootte overwegend bepaald wordt door het product van de proximale helling van de flap met het volume van flap plus adventitia. Om vast te kunnen stellen of de behandelde groepen en de controlegroep wat deze parameters betreft vergelijkbaar waren, werd het volume, de helling en het product van deze twee parameters van zowel de behandelde groepen als van de controlegroep bepaald (tabel 11 t/m 13) en vergeleken (tabel 14 t/m 16).

Uit de gegevens in deze tabellen komen geen significante verschillen naar voren wat betreft de variabelen, die in de regressieberekening van de thrombusgrootte in de controlegroep (zie tabel 9) gebruikt werden. In tabel 13 valt echter wel op, dat het gevonden product in de met ticlopidine 30 mg behandelde groep, hoewel niet significant, duidelijk lager is dan in de overige groepen.

Tabel 11 - Proximale helling

groep		n	gemiddelde ± standaard- deviatie	mediaan	spreiding
controles		19	1.76±1.53	1.44	0.32-6.33
ASA	2.5 mg	8	2.53±1.37	2.59	0.84-4.00
ASA	5.0 mg	8	2.15±1.61	1.08	0.51-5.50
ticlopidine	10 mg	14	2.08±1.37	1.89	0.42-4.80
ticlopidine	30 mg	12	1.59±0.88	1.50	0.63-3.33
warfarine		9	1.18±0.55	0.94	0.49-2.09

Tabel 12 - Volume flap plus adventitia

groep		n	gemiddelde	mediaan	spreiding
controles		19	1421	1211	205-4107
ASA	2.5 mg	8	1228	1117	699-2174
ASA	5.0 mg	8	866	896	535-1297
ticlopidine	10 mg	14	1628	958	386-6224
ticlopidine	30 mg	12	644	581	132-1522
warfarine		9	2163	2030	569-5593

Tabel 13 - Product volume flap plus adventitia en proximale helling

groep		n	gemiddelde	mediaan	spreiding
controles		19	2808	1384	107-17140
ASA	2.5 mg	8	2741	2778	1226-4278
ASA	5.0 mg	8	1830	1288	338-5016
ticlopidine	10 mg	14	2336	2197	463-5611
ticlopidine	30 mg	12	1240	559	139-3515
warfarine		9	2131	1868	493-5034

Tabel 14 - Variantie-analyse van proximale hellingen

	kwadraatsom	gemiddelde kwadraatsom	vrijheidsgraden
binnen groepen	108.76	1.70	64
tussen groepen	10.18	2.04	5
totaal	118.94	1.72	69

F_{5,64} = 1.198; p > 0.25.

Tabel 15 - Variantie-analyse van volumina flap plus adventitia

	kwadraatsom*	gemiddelde kwadraatsom*	vrijheidsgraden
binnen groepen	86.79	1.36	64
tussen groepen	15.08	3.02	5
totaal	101.86	1.48	69

* $\times 10^{-6}$

F_{5,64} = 2.224; p > 0.05.

Tabel 16 - Variantie-analyse van het product van volume flap plus adventitia en proximale helling

	kwadraatsom*	gemiddelde kwadraatsom*	vrijheidsgraden
binnen groepen	356.49	5.57	64
tussen groepen	25.95	5.19	5
totaal	382.44	5.54	69

* $\times 10^{-6}$

F_{64,5} = 1.073; p > 0.25.

Samenvattend wordt geconcludeerd:

- dat het verschil in aantallen afsluitende en niet-afsluitende thrombi in de verschillende groepen niet toegeschreven kan worden aan verschillen in thrombogene prikkel tussen de groepen, en
- dat de berekening van het thrombusvolume op grond van de parameter product volume flap plus adventitia en proximale helling ook toegepast mag worden op de behandelde groepen omdat deze parameter tussen de groepen niet significant verschilt.

6.4 - HET EFFECT VAN AGGREGATIEREMMERS EN ANTISTOLLING OP HET THROMBUSVOLUME

Inleiding

In het voorgaande is uiteengezet, dat het gemeten thrombusvolume in de controlegroep kan worden voorspeld met de formule:

$$\text{thrombusvolume} = 1.551 \times (\text{product proximale helling en volume flap plus adventitia}) - 257.$$

De correlatie tussen afhankelijke en onafhankelijke variabelen was 0.976. Om te bepalen of de behandeling effect had op het thrombusvolume, werden voor elke groep de volgende berekeningen uitgevoerd.

Voor elk dier werden de morfometrische variabelen volume flap plus adventitia alsmede de proximale helling van de flap bepaald (zie 6.2). Vervolgens werd voor elk dier het product van deze variabelen berekend. Substitutie van dit product in de regressievergelijking van thrombus op product gaf voor elk dier het thrombusvolume, dat op grond van deze regressievergelijking verwacht kon worden. Deze waarde werd vergeleken met het gemeten thrombusvolume, waarna het verschil tussen verwacht en gemeten thrombusvolume (= Δ) bepaald werd (zie onderstaand voorbeeld); een positief getal voor Δ geeft aan, dat de gevormde thrombus kleiner was dan verwacht.

Voorbeeld: rat 63 uit de warfarinegroep

- volume flap plus adventitia (gemeten)	569.10 ⁵ μm^3
- proximale helling (gemeten)	2.0
- product = 2 x 569.10 ⁵ μm^3	1138.10 ⁵ μm^3
- verwacht thrombusvolume:	
berekend (1.551 x 1138 - 257)	1508.10 ⁵ μm^3
- gemeten thrombusvolume	630.10 ⁵ μm^3
- Δ thrombusvolume (1508 - 630)	+878 μm^3

Deze berekening werd uitgevoerd voor alle niet-afsluitende thrombi in de behandelde groepen. Voor de dieren met een afsluitende thrombus werden deze berekeningen niet uitgevoerd omdat in deze dieren het werkelijke

thrombusvolume niet te bepalen was wegens het ontstaan van secundaire stasethrombi.

Vervolgens werd getoetst of de verschillen tussen gemeten en verwacht thrombusvolume significant groter of kleiner dan nul waren. Hiervoor werd de verdelingsvrije toets van Wilcoxon (signed rank test) gebruikt. Indien in deze test $p < 0.05$ gevonden werd, dan werd geconcludeerd, dat de thrombi in de experimentele groep significant groter of kleiner waren dan verwacht.

Tevens werd van elke groep een regressievergelijking opgesteld voor:

- de regressie van het gemeten thrombusvolume op het product van volume flap plus adventitia en de proximale helling, en
- de regressie van het gemeten thrombusvolume op het volume van flap plus adventitia.

Het effect van warfarine op het thrombusvolume

Zowel de gemeten als de uit de regressievergelijking berekende thrombusvolumina zijn samengevat in tabel 17. In deze en volgende figuren geeft de onderbroken lijn de regressielijn weer van de controles. De relatie tussen gemeten thrombusvolume en het product van flapvolume en proximale hellingshoek is grafisch weergegeven in figuur 17. De bijbehorende regressievergelijking luidt: thrombusvolume = 1.237 . (product) - 884.

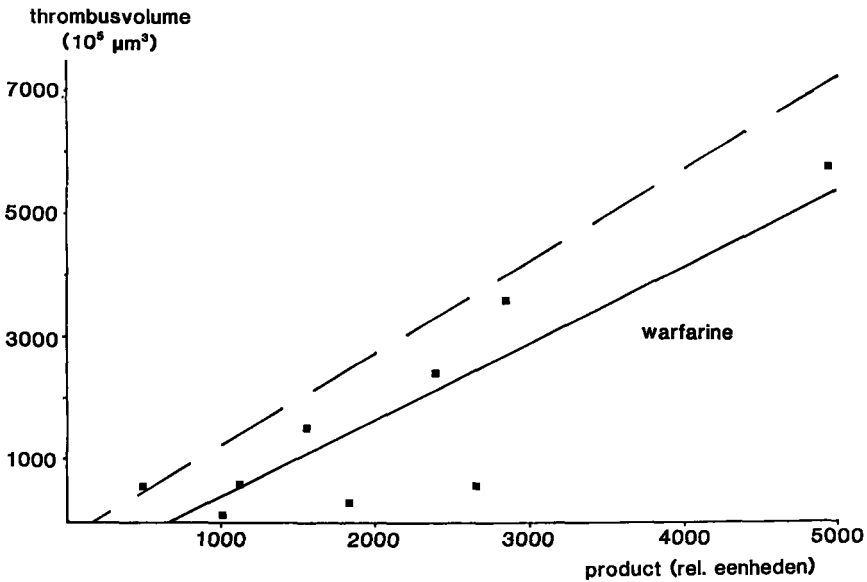
Tabel 17 - Het effect van warfarine op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
1	1508	630	+ 878
2	7551	5831	+1720
3	2640	319	+2321
4	4233	3654	+ 579
5	2189	1565	+ 624
6	1358	95	+1263
7	508	618	- 110
8	3918	614	+3304
9	3534	2441	+1093

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Wilcoxon's signed rank test: -1, + 44; n=9; $p < 0.01$.

Bij geen van de dieren werd een afsluitende thrombus gezien; 8 dieren hadden een kleinere thrombus dan verwacht en in 1 rat (nr. 7: normotest bij operatie 70 en bij opoffering 145 seconden) was de gevonden thrombus iets groter dan verwacht. Op grond van Wilcoxon's test kan geconcludeerd worden, dat de thrombus in de met warfarine behandelde groep significant kleiner is dan verwacht mocht worden.



Figuur 17 - Relatie product met thrombusvolume in de warfarinegroep.

Het effect van ASA 2.5 mg op het thrombusvolume

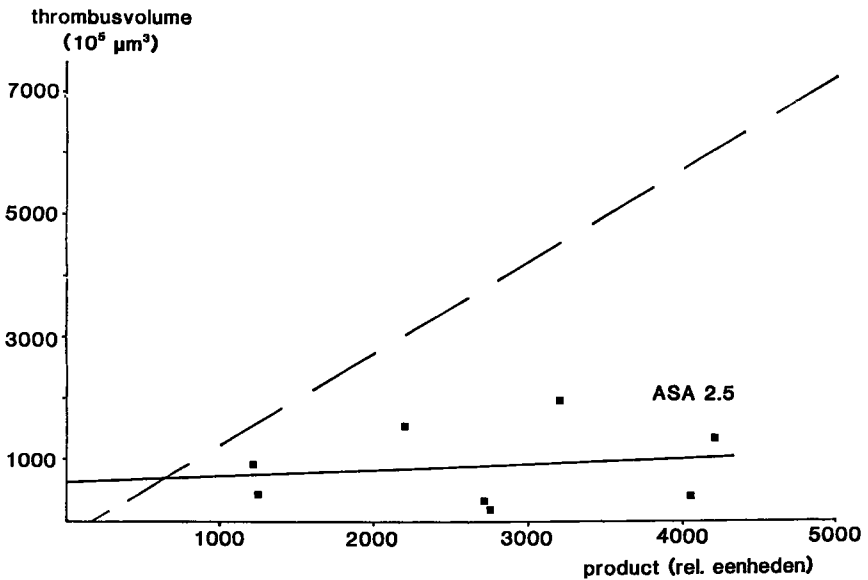
De in deze groep gevonden volumina zijn vermeld in tabel 18; in de groep van 8 dieren traden geen afsluitende thrombi op. De relatie tussen het thrombusvolume en het product is grafisch weergegeven in figuur 18. De regressievergelijking luidt: $\text{thrombusvolume} = 0.089 \cdot (\text{product}) + 624$. In deze groep waren alle gemeten thrombi kleiner dan verwacht. In vergelijking met de controlegroep, resulteerde behandeling met ASA 2.5 mg/kg in een significante vermindering van het thrombusvolume.

Tabel 18 - Het effect van ASA 2.5 mg op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
1	3199	1531	+1668
2	1645	909	+ 746
3	6378	1332	+5046
4	4024	299	+3725
5	4801	1968	+2833
6	6139	375	+5764
7	1693	408	+1285
8	4080	133	+3947

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Wilcoxon's signed rank test: 0, + 36; n=8; $p < 0.01$.



Figuur 18 - Relatie product met thrombusvolume in de groep ASA 2.5 mg.

Het effect van ASA 5.0 mg op het thrombusvolume

In deze groep trad bij 1 van de 8 dieren een afsluitende thrombus op. De gevonden thrombusvolumina in de overige 7 ratten zijn weergegeven in

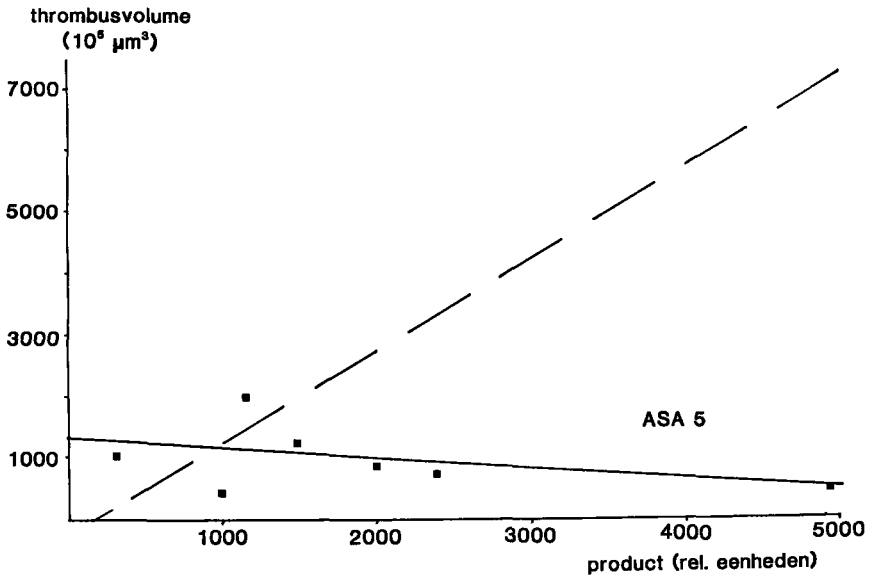
tabel 19 en de relatie tussen product en thrombusvolume wordt grafisch weergegeven in figuur 19. De regressievergelijking luidt: thrombusvolume = -0.174 . (product) + 1340.

Tabel 19 - Het effect van ASA 5.0 mg op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ*
1	267	1118	- 851
2	1319	440	+ 879
3	2116	1292	+ 824
4	7523	442	+7081
5	3537	763	+2774
6	2902	907	+1995
7	1618	2054	- 436

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Wilcoxon's signed rank test: -4, +24; n=7; p > 0.05.



Figuur 19 - Relatie product met thrombusvolume in de groep ASA 5.0 mg.

In de groep niet-afsluitende thrombi was in 2 ratten een grotere thrombus aanwezig dan verwacht. Om deze reden kon in deze groep geconcludeerd worden, dat behandeling met ASA 5.0 mg het thrombusvolume niet significant deed afnemen. Bij analyse van beide ASA-groepen tezamen, is de afneming in thrombusvolume echter wel significant. Wilcoxon's signed rank test: -5, +115; n=15; p<0.01.

Het effect van ticlopidine (10 en 30 mg) op het thrombusvolume

In de met ticlopidine behandelde groepen werd geen significant effect op het thrombusvolume gevonden. In de met 10 mg behandelde groep werden 11 van de 14 dieren geanalyseerd (3 dieren hadden een afsluitende thrombus) (zie tabel 20 en figuur 20). De met 30 mg behandelde groep omvatte 12 dieren, waarvan 2 dieren met een afsluitende thrombus, zodat er 10 geanalyseerd werden (tabel 21 en figuur 21).

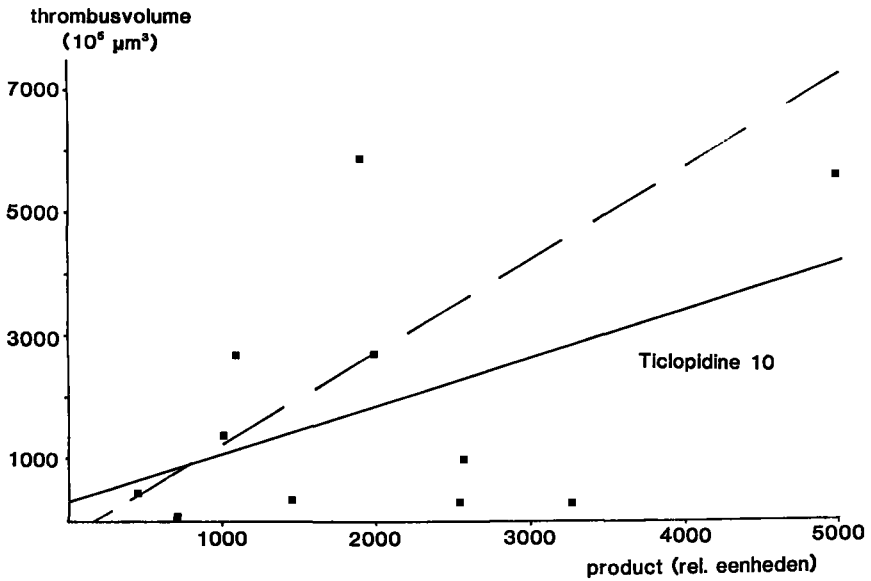
De regressievergelijking voor ticlopidine 10 mg luidt: thrombusvolume = 0.741 . (product) + 364 en die voor ticlopidine 30 mg luidt: thrombusvolume = 0.614 . (product) + 942.

Tabel 20 - Het effect van ticl. 10 mg op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
1	4877	242	+4635
2	2777	5946	-3169
3	2029	360	+1669
4	136	31	+ 105
5	461	466	- 5
6	3749	229	+3520
7	2892	2704	+ 188
8	1479	2713	-1234
9	8446	5928	+2518
10	3797	958	+2839
11	1344	1392	- 48

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Wilcoxon's signed rank test: -17, +49; n=11; p > 0.05.



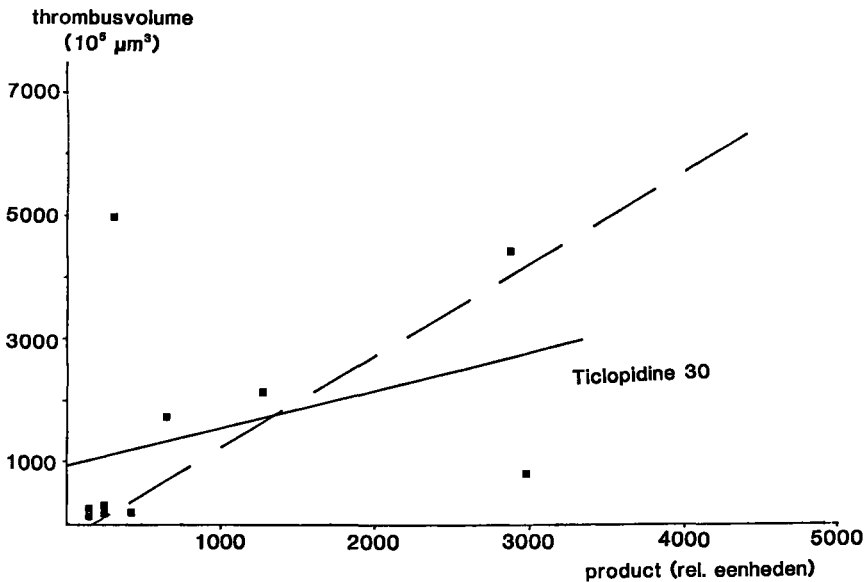
Figuur 20 - Relatie product met thrombusvolume voor ticlopidine 10 mg.

Tabel 21 - Het effect van ticl. 30 mg op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
1	802	1763	- 961
2	- 4	216	- 220
3	418	182	+ 236
4	135	244	- 109
5	- 41	127	- 168
6	4464	825	+3639
7	152	234	- 82
8	4303	4496	- 193
9	1057	2150	-1093
10	238	5046	-4808

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Wilcoxon's signed rank test: -40, +15; n=10; p > 0.05.



Figuur - 21 - Relatie product met thrombusvolume voor ticlopidine 30 mg.

Het verband tussen de flapparameters en het thrombusvolume

Zoals eerder beschreven voor de controlegroep (zie 6.2), werd de regressie van het thrombusvolume op de flapparameters ook berekend voor de vijf behandelde groepen. Hiertoe werden wederom de niet-afsluitende thrombi uit deze groepen geanalyseerd. Ter vergelijking zijn ook de regressieparameters van de controlegroep opgenomen. In tabel 22 zijn de regressieparameters a en b van de regressievergelijking thrombusvolume = $a \cdot (\text{product}) + b$ opgenomen, waarbij a de hellingshoek en b het intercept van de regressielijn met de Y-as is. In deze tabel valt op, dat alleen in de warfarinegroep een significante correlatie wordt gevonden tussen het product van proximale helling en flapvolume en het thrombusvolume. In de vergelijking van deze groep met de controlegroep is de hellingsparameter a niet significant verschillend, maar is de intercept parameter b significant lager in de warfarinegroep. Ook in de andere groepen waren deze parameters vaak significant verschillend van die van de controlegroep. Hierbij dient wel opgemerkt te worden, dat de correlatiecoëfficiënten (r) voor de met ASA en ticlopidine behandelde groepen niet statistisch significant zijn, zodat vergelijking van de parameters voor deze groepen van twijfelachtige waarde is. De regressielijnen van de verschillende groepen tezamen zijn weergegeven in figuur 22.

Tabel 22 - Overzicht regressieparameters op het product

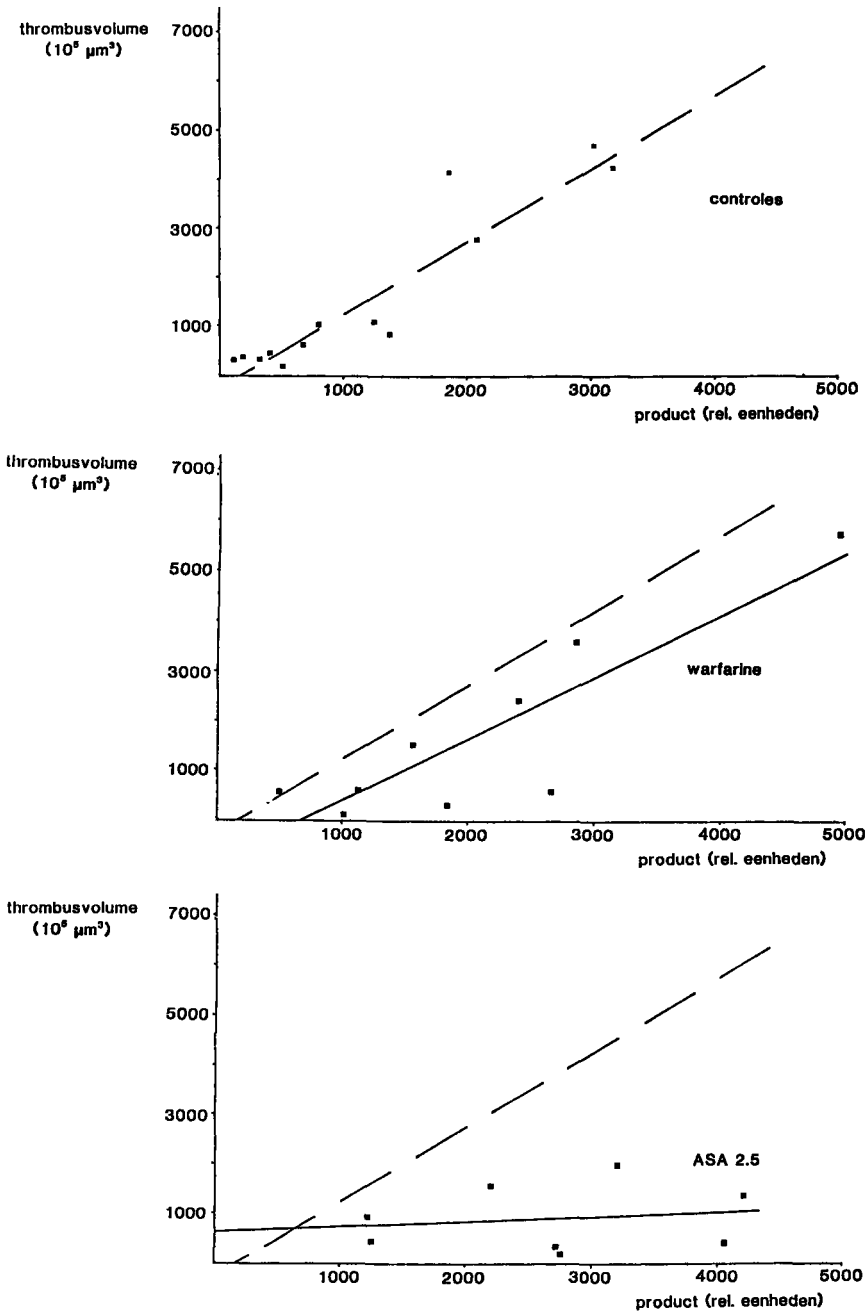
groep	n	a	b	r*
controles	14	+1.551	-257	+0.976 p<0.01
warfarine	9	+1.237 n.s.	-884 p<0.005	+0.873 p<0.01
ASA 2.5 mg	8	+0.089 p<0.001	+624 p<0.001	+0.153 p>0.05
ASA 5.0 mg	7	-0.174 p<0.001	+1340 p<0.05	-0.469 p>0.05
ticlopidine 10 mg	11	+0.741 p<0.05	+364 n.s.	+0.492 p>0.05
ticlopidine 30 mg	10	+0.614 p<0.05	+942 n.s.	+0.373 p>0.05

*** significanties berekend ten opzichte van de controles**

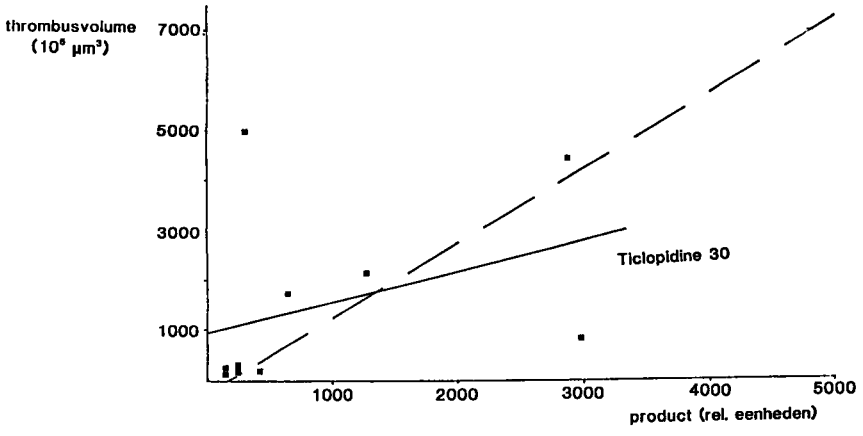
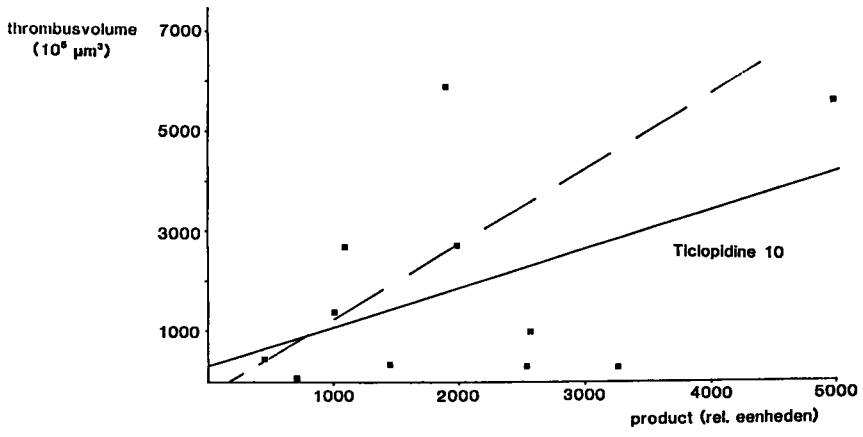
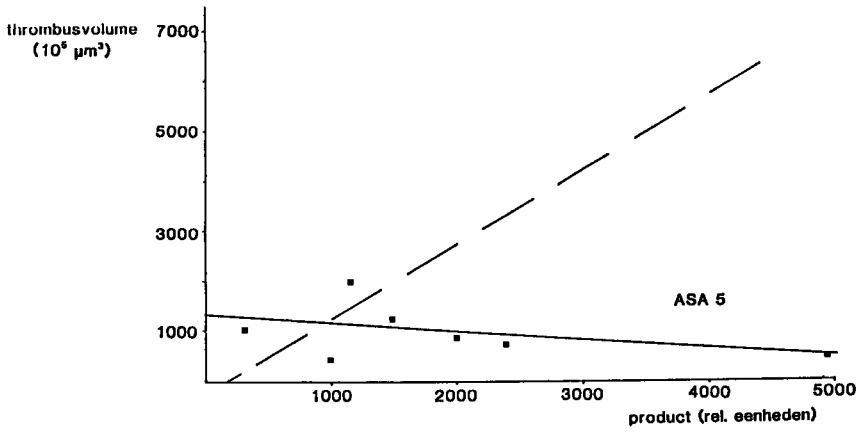
Tabel 23 - Overzicht regressieparameters op het volume

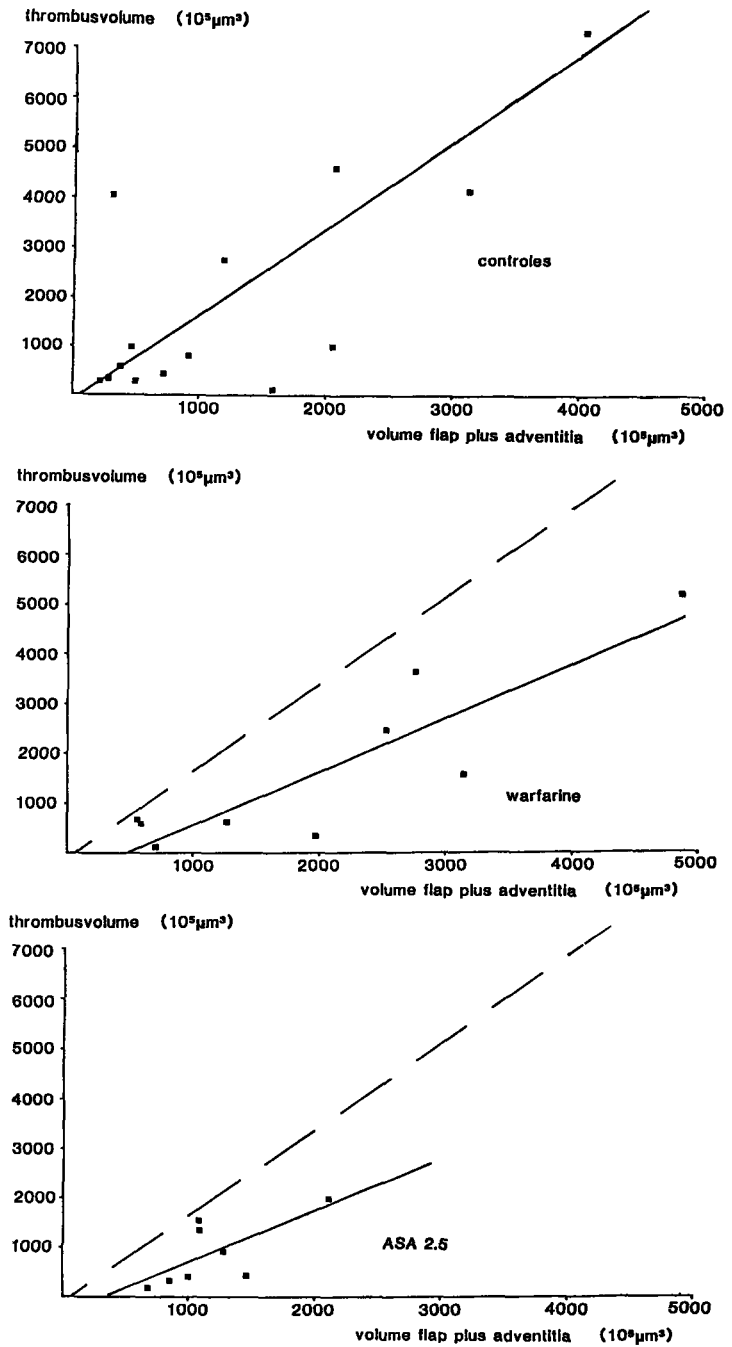
groep	n	a	b	r*
controles	14	+1.762	-63	+0.778 p<0.01
warfarine	9	+1.054	-528	+0.898 p<0.01
ASA 2.5 mg	8	+1.028	-393	+0.693 p<0.05
ASA 5.0 mg	7	+0.678	+418	+0.338 n.s.
ticlopidine 10 mg	11	+0.275	+1398	+0.229 n.s.
ticlopidine 30 mg	10	+1.379	+762	+0.311 n.s.

*** significanties berekend ten opzichte van de controles**

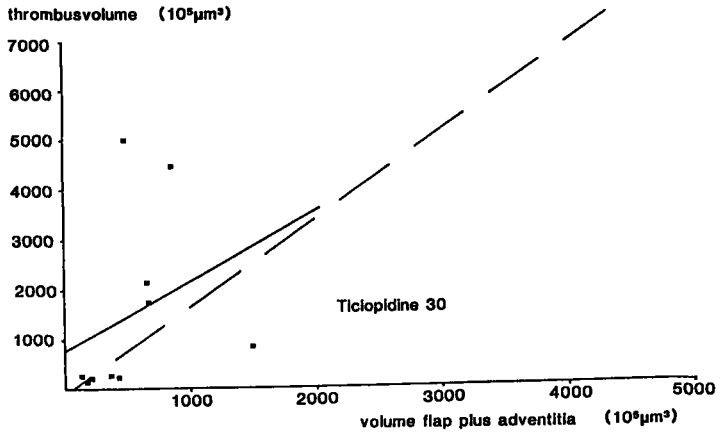
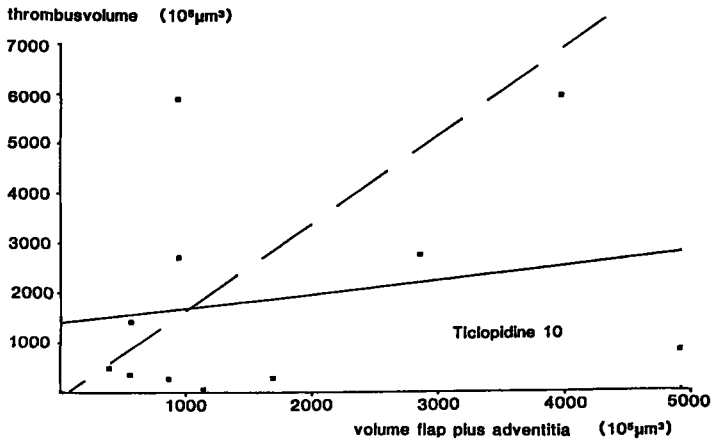
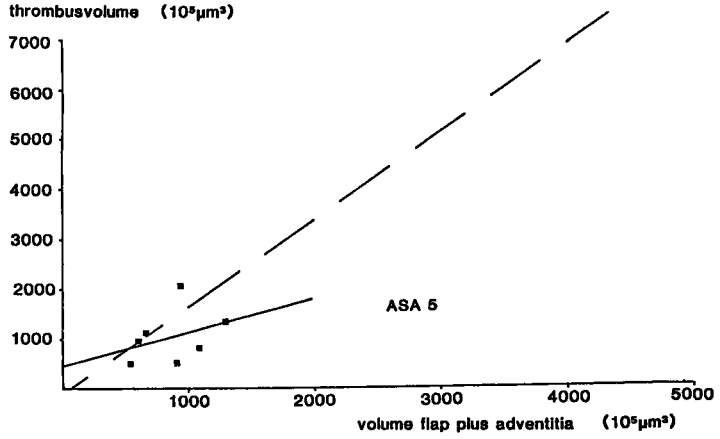


Figuur 22 - Overzicht van de relatie product met thrombusvolume voor alle groepen.





Figuur 23 - Overzicht van de relatie flapvolume met thrombusvolume voor alle groepen.



In tabel 23 zijn de resultaten weergegeven van de regressie van het gemeten thrombusvolume op alleen het volume van flap plus adventitia: $\text{thrombusvolume} = a \cdot (\text{volume flap plus adventitia}) + b$. De regressielijnen in de verschillende groepen zijn weergegeven in figuur 23.

In de meeste experimentele groepen is ook in deze regressieberekening de correlatiecoëfficiënt van de regressie niet meer significant; alleen in de warfarinegroep en (in mindere mate) in de ASA 2.5 mg-groep bestaat nog een significante correlatie tussen thrombusvolume en flapvolume, waarbij zowel de hellingsparameter a als de asafsnede b significant dalen ten opzichte van de controlegroep.

6.5 - HET EFFECT VAN T-PA OP HET THROMBUSVOLUME

De met t-PA behandelde dieren zijn verdeeld in twee groepen, namelijk de direct na thrombusinductie en de 24 uur na thrombusinductie behandelde dieren. Voor beide groepen zijn controledieren geopereerd. Voor de direct na thrombusinductie behandelde groep was een aparte controlegroep noodzakelijk omdat hier de experimentele omstandigheden verschilden van de groep die pas na 24 uur behandeld werd. Voor de tweede groep was een aparte controlegroep noodzakelijk omdat de experimenten met t-PA werden uitgevoerd na afsluiting van alle andere experimenten. Het was derhalve niet uitgesloten, dat het volume van de geïnduceerde thrombi door de toegenomen operationele ervaring beïnvloed was.

Behandelingresultaten met t-PA direct na thrombusinductie

In deze groep van 19 dieren (7 controles en 12 behandelde dieren) werd in de controlegroep 1 afsluitende thrombus gevonden. De meetgegevens van de twee groepen zijn opgenomen in tabel 24 en 25, waarin ter vergelijking ook de gegevens zijn vermeld van de controlegroep van de dieren behandeld met aggregatieremmende middelen en warfarine. Tussen de met t-PA behandelde dieren en hun controlegroep bestonden wat betreft de parameters proximale helling en volume flap plus adventitia geen significante verschillen. Opvallend is wel, dat de waarden voor het volume van flap plus adventitia alsmede voor het product in deze twee groepen kleiner waren dan voor de controlegroep van de aggregatieremmers.

Zoals reeds beschreven voor de controles van de aggregatieremmende middelen en warfarine, is ook voor deze twee groepen het verband berekend tussen helling en flapvolume of hun product enerzijds en thrombusvolume anderzijds. In tegenstelling tot bij de controles van de met aggregatieremmende middelen, warfarine en na 24 uur met t-PA behandelde dieren, werd in deze groepen geen significante correlatie gevonden tussen het product of het flapvolume met het gemeten thrombusvolume (zie tabel 26 en 27). Om deze reden mag het gehanteerde berekeningsmodel niet toegepast worden op deze twee groepen. In hoeverre er sprake was van een verschil in volumina tussen de twee groepen, werd derhalve getoetst door directe vergelijking van de gemeten thrombusvolumina. Met de verdelingsvrije test van Wilcoxon voor twee groepen bleek geen significant verschil te bestaan tussen de controlegroep en de direct met t-PA behandelde groep.

De getallen voor het thrombusvolume in de twee groepen waren:

		thrombusvolume ($10^5 \mu\text{m}^3$)	
-	<u>controlegroep</u> (n=6)	gemiddelde	1429
		mediaan	1700
		spreiding	356-1995
	(één afsluitende thrombus met volume 4195)		
-	<u>t-PA-groep</u> (n=12)	gemiddelde	1196
		mediaan	1138
		spreiding	480-1805
	Wilcoxon's test voor twee steekproeven: n=18; T=68; p=0.22.		

Tabel 24 - Het effect van t-PA direct op het thrombusvolume

controles		gemeten	t-PA direct		gemeten
t-PA direct		thrombusvolume*	lage dosis		thrombusvolume*
rat nr.			rat nr.		
1		1984	1		692
2		356	2		480
3		839	3		1741
4		1771	4		1570
5		1995	5		999
6		1629	6		693
7		4195	7		1276
			8		1705
			9		966
			10		737
			11		1694
			12		1805

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Tabel 25 - Meetgegevens t-PA direct en controles

proximale helling

	n	gem.± s.d.	mediaan	spreiding
controles	7	1.61±0.84	1.20	0.75-2.67
t-PA direct	12	1.12±0.54	0.96	0.60-2.20
controles aggr.remmers	19	1.76±1.53	1.44	0.32-6.33

volume flap plus adventitia

	n	gemiddeld	mediaan	spreiding
controles	7	819	745	342-1354
t-PA direct	12	798	620	320-2107
controles aggr.remmers	19	1421	1211	205-4107

product proximale helling en volume

	n	gemiddeld	mediaan	spreiding
controles	7	1352	1029	383-2565
t-PA direct	12	951	466	364-2592
controles aggr.remmers	19	2808	1384	107-17140

Tabel 26 - Regressie thrombusvolume op product (proximale helling en volume flap plus adventitia)

	n	a	b	r
controles	6	-0.209	+1693	-0.314
t-PA direct	12	+0.278	+932	+0.488
controles aggr.remmers	14	+1.551	-257	+0.976

Tabel 27 - Regressie van thrombusvolume op het volume van flap plus adventitia

	n	a	b	r
controles	6	-1.310	+2525	-0.778
t-PA direct	12	+0.549	+758	+0.600
controles aggr.remmers	14	+1.762	-63	+0.778

Behandelingsresultaten met t-PA 24 uur na thrombusinductie

Zowel bij de controles (n=14) als bij de met de hoge dosis t-PA behandelde dieren (n=7) werd 1 afsluitende thrombus gevonden; in de met een lage dosis t-PA behandelde dieren (n=11) kwamen 3 afsluitende thrombi voor. Tussen de drie genoemde groepen bestond geen significant verschil in het optreden van afsluitende thrombi. Voor de controles zijn de meetgegevens van de volumina vermeld in tabel 28 en 29.

Tabel 28 - Thrombusvolumina in de controlegroep

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
1	1323	369	+954
2	698	437	+261
3	315	391	- 76
4	511	1412	-901
5	764	470	+294
6	635	679	- 44
7	447	503	- 56
8	578	352	+226
9	3097	2375	+722
10	761	995	-234
11	945	900	+ 45
12	727	473	+254
13	2502	3306	-804

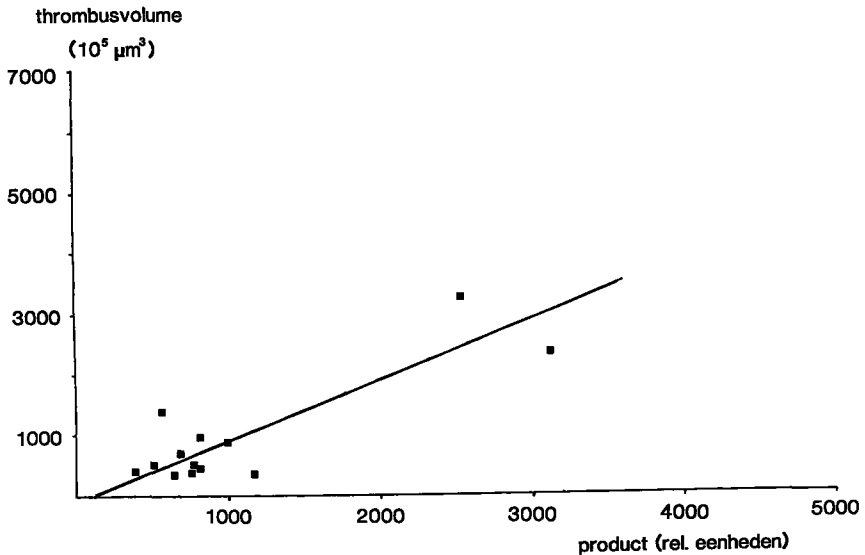
* $10^5 \mu\text{m}^3$

Tabel 29 - Overzicht meetgegevens in de controlegroep

	gem.	s.d.	mediaan	spreiding
proximale helling	1.58	1.03	1.20	0.51-4.0
volume flap+adventitia	824	-	786	447-1722
product	1196	-	821	393-2571
thrombusvolume	1121	-	591	352-3306

In de controlegroep bestond een significante correlatie tussen thrombusvolume en het product van proximale helling en volume flap plus adventitia ($r=0.827$; $p < 0.01$), hetgeen ook in de controles van de met aggregatieremmende middelen en warfarine behandelde groep gevonden was. De regressie van thrombus op product had als formule: thrombusvolume = 1.004 . Pr (helling x volume) - 80 en wordt grafisch weergegeven in figuur 24. In deze controlegroep bestond nèt geen significante relatie tussen thrombusvolume en volume flap plus adventitia ($r=0.470$; $p=0.08$). Voor de met lage en hoge dosis t-PA behandelde groepen zijn de meetgegevens samengevat in tabel 30 en 31.

Tussen de behandelde groepen en de controlegroep bestonden geen significante verschillen wat betreft de proximale helling en het volume van flap plus adventitia ($p > 0.05$). Tussen deze drie groepen bestond voor het product ($p < 0.01$) echter wèl een significant verschil: in de met de lage dosis t-PA behandelde groep was het product significant groter dan in de controlegroep en de met hoge dosis t-PA behandelde groep; tussen de laatste twee groepen bestond echter geen verschil (zie tabel 31).



Figuur 24 - Relatie product met thrombusvolume voor de t-PA-controles.

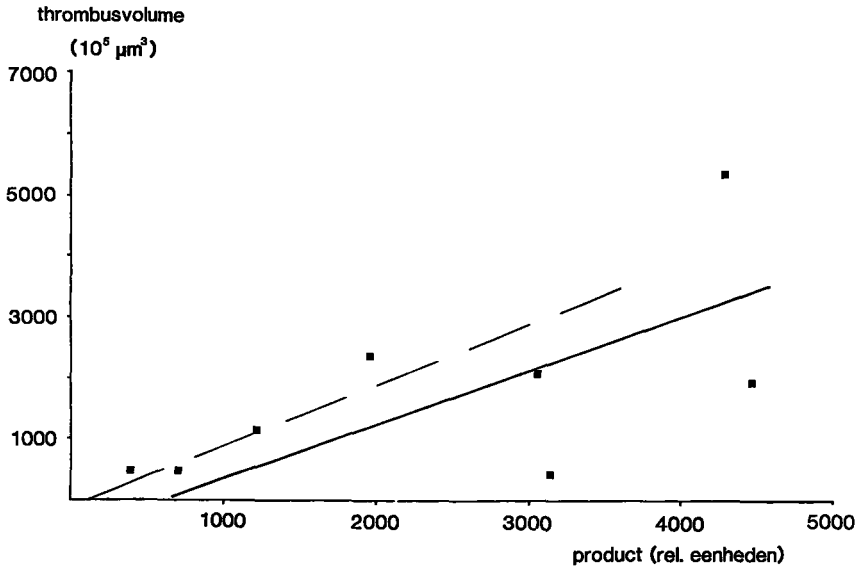
Tabel 30 - Het effect van t-PA na 24 uur op het thrombusvolume

rat nr.	verwacht thrombusvolume*	gemeten thrombusvolume*	Δ *
<hr/>			
<u>lage dosis t-PA na 24 uur</u>			
1	1919	2350	- 431
2	3083	2067	+1016
3	3113	404	+2709
4	4433	1943	+2490
5	641	402	+ 239
6	334	405	- 71
7	1159	1087	+ 72
8	4246	5413	-1167
<u>hoge dosis t-PA na 24 uur</u>			
1	417	281	+ 136
2	287	426	- 140
3	959	984	- 25
4	191	1359	-1168
5	1813	1001	+ 812
6	1162	192	+ 970
<hr/>			

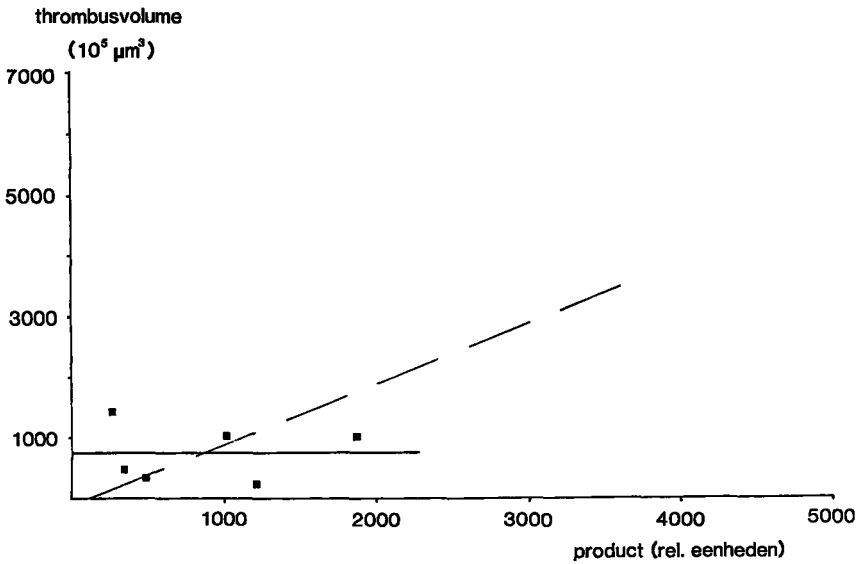
* $10^5 \mu\text{m}^3$

De relatie tussen het gevonden thrombusvolume en het product òf het volume van flap plus adventitia voor de drie groepen is weergegeven in tabel 32 en 33 (de dieren met een afsluitende thrombus zijn niet in de berekening opgenomen) alsmede in figuur 25 en 26. Wederom blijkt in de controlegroep een zeer significante correlatie ($p < 0.01$) te bestaan tussen thrombusvolume en product ($r=0.827$). Ook na behandeling met een lage dosis t-PA is deze correlatie significant ($r=0.761$; $p=0.02$).

Indien de verwachte thrombusvolumina in de laag gedoseerde t-PA groep vergeleken worden met de gemeten thrombusvolumina, blijkt een niet-significante afneming (Wilcoxon's test: +31, -5; $n=8$; n.s.). Ook bij vergelijking van de verwachte en gemeten volumina in de hoog gedoseerde groep (waarin de correlatie tussen thrombusvolume en product echter niet significant was; zie tabel 32) bleek geen significant verschil te bestaan (-10, +11; $n=6$; n.s.).



Figuur 26 - Relatie product met thrombusvolume voor de lage dosis t-PA.



Figuur 27 - Relatie product met thrombusvolume voor de hoge dosis t-PA.

Tabel 31 - Overzicht meetgegevens hoge en lage dosis t-PA na 24 uur

	n	gemiddeld	s.d.	mediaan	spreiding
proximale helling					
controles	14	1.58	1.03	1.20	0.51-4.00
lage dosis t-PA	11	1.85	0.97	1.40	0.67-3.40
hoge dosis t-PA	7	1.67	1.08	1.60	0.32-3.20
contr.aggr.remmers	19	1.76	1.53	1.44	0.32-6.33
volume flap plus adv.					
controles t-PA	14	824	-	786	447-1722
lage dosis t-PA	11	1823	-	1436	343-8505
hoge dosis t-PA	7	584	-	589	275- 845
contr.aggr.remmers	19	1421	-	1211	205-4107
product					
controles t-PA	14	1196	-	821	393-2571
lage dosis t-PA	11	2585	-	2211	412-5741
hoge dosis t-PA	7	871	-	808	270-1885
contr.aggr.remmers	19	2808	-	1384	107-17140

In de twee groepen (vooral in de hoog gedoseerde groep) viel met name de significante correlatie op van het thrombusvolume met het volume van flap plus adventitia (beide $p < 0.05$), met zeer hoge waarden voor de hellingparameter a (zie tabel 33). Aangezien deze correlatie in de controle-groep echter niet significant was ($r=0.470$), werd geen test uitgevoerd.

Tabel 32 - Regressie van thrombusvolume op product

	n	a	b	r
controles	13	1.004	-80	+0.827/ $p < 0.01$
lage dosis t-PA	8	0.690/n.s.	+84/n.s.	+0.761/ $p = 0.02$
hoge dosis t-PA	6	0.034/ $p = 0.06$	+667/n.s.	+0.045/n.s

Tabel 33 - Regressie thrombusvolume op volume flap plus adventitia

	n	a	b	r
controles	13	1.140	+ 181	+0.470/p > 0.05
lage dosis t-PA	8	2.453	-1184	+0.730/p < 0.05
hoge dosis t-PA	6	1.792	- 364	+0.817/p < 0.05

Samenvattend, zijn in tabel 34 en 35 de thrombusvolumina in alle met t-PA behandelde groepen en hun controles weergegeven.

Tabel 34 - Het effect van t-PA direct na operatie op het thrombusvolume

	n	thrombusvolumina*		
		gem.	mediaan	spreiding
controles (1 afsluitende thrombus: 4195)	6	1429	1700	356-1995
t-PA	12	1196	1138	480-1805

* $10^5 \mu\text{m}^3$

Tabel 35 - Het effect van t-PA 24 uur na operatie op het thrombusvolume

	n	thrombusvolumina*		
		gem.	mediaan	spreiding
controles (1 afsluitende thrombus: 3035)	13	1121	591	352-3306
lage dosis t-PA (3 afsluitende thrombi: 4629, 6112, 7075)	8	1559	1515	402-5413
hoge dosis t-PA (1 afsluitende thrombus: 5000)	6	707	705	192-1359

* $10^5 \mu\text{m}^3$

6.6 - Samenvatting van de resultaten

Het effect van aggregatieremmende middelen, warfarine en t-PA op een chirurgisch geïnduceerde arteriële thrombus is morfometrisch onderzocht. In de 24-uurs controlegroepen werd een zeer significante correlatie vastgesteld tussen het gemeten thrombusvolume enerzijds en twee kenmerken van de thrombusvorming-inducerende aortaflap anderzijds: flapvolume en snelheid van lumenvernaauwing door de aortaflap. Op basis van deze relatie kon voor iedere rat, uitgaande van de gemeten parameters (flapvolume en proximale helling van de flap), het verwachte thrombusvolume berekend worden. Door vergelijking van dit verwachte volume met het gemeten volume werd getoetst of de behandeling geresulteerd had in een significant effect op het gevonden thrombusvolume.

Alleen in de met warfarine en ASA 2.5 mg behandelde groepen werd een vermindering van het thrombusvolume vastgesteld; ook deze twee behandelingschema's resulteerden in een significante afnemning van het aantal afsluitende thrombi.

Tabel 36 - Overzicht van de resultaten

groep		significant verschil tussen verwachte en gemeten thrombus	significant verschil tussen helling en intercept	
warfarine		+	-	+
ASA	2.5 mg	+	+	+
ASA	5.0 mg	-	+	+
ticlopidine	10 mg	-	+	-
ticlopidine	30 mg	-	+	-
t-PA direct		-	n.v.t.	n.v.t.
t-PA 24 uur:				
- lage dosis		-	-	-
- hoge dosis		-	±*	-
*	p = 0.06			
+	p < 0.05			
-	p > 0.05			

In alle gevallen wordt in het aortaflapmodel een thrombus opgewekt, waarvan het volume op basis van twee flapparameters voorspelbaar is. Deze parameters zijn: het volume van de flap (plus adventitia) en de helling van de flap, dat wil zeggen de snelheid waarmee het lumenoppervlak verkleind c.q. het lumen gestenoseerd wordt.

Ten aanzien van de eerste parameter bestaat een grote variatie, die afhankelijk is van de uitgevoerde chirurgische ingreep, waardoor een "standaard-flap" (een identieke flap) niet eenvoudig te reproduceren is (zie tabel 9). Ondanks de relatief beperkte reproduceerbaarheid van de flap wegens de morfologische variaties in de flap, blijkt het mogelijk om de flap op basis van zijn parameters getalsmatig te beschrijven en daarmee een voorspelling te doen van het thrombusvolume.

Uit de regressieprocedure blijkt de parameter proximale helling van groot belang te zijn. Deze haemodynamische parameter beschrijft de positie van de flap in het vat alsmede de snelheid van stenosering en bepaalt mede de ontstane thrombusgrootte. In andere experimentele arteriële modellen wordt gebruik gemaakt van mechanische, chemische, elektrische of laserstimulatie, maar is òf de haemodynamische factor van ondergeschikt belang òf wordt deze niet beschreven en gaat derhalve verloren.

Een aantal studies benadrukt deze factor juist wèl (zie hoofdstuk 2.5) en beschrijft de mate van stenosering, het effect ervan op de bloedstroom alsmede op het optreden van thrombose.

In deze studie hebben de morfometrische metingen geleid tot een exacte beschrijving en getalsmatige reconstructie van het vat, de flap en de thrombus zelf. In tegenstelling tot andere meetmethoden, zoals bijvoorbeeld het wegen van een uitgeprepareerde thrombus of het meten van radio-actief gelabelde plaatjesaggregaten, toont morfometrie van het materiaal de interrelatie aan tussen vat, stimulus en thrombus. Hoewel de arbeidsintensiviteit van de meetmethode een nadeel is, is het inzicht in de wijze waarop in dit model thrombusvorming tot stand komt, passend in de triade van Virchow, een groot voordeel.

Het belang van randomisering aan het begin van de operatie blijkt uit het feit, dat er een verschil bestaat tussen de volumina van flap (plus adventitia) en het produkt van helling en volume, en niet van de helling alleen. Dit verschil bestaat tussen de direct na operatie en met hoge dosis t-PA behandelde dieren en hun controles enerzijds en de met plaatjesremmers en warfarine behandelde dieren en hun controles alsmede de na 24 uur met de lage dosis t-PA behandelde dieren anderzijds. Als verklaring voor dit verschil kan worden aangevoerd, dat de eerstgenoemde groepen op een later tijdstip werden geopereerd en de operatietechniek door de toegenomen ervaring wellicht resulteerde in een kleinere flap, terwijl de helling niet beïnvloed werd (zie tabel 31).

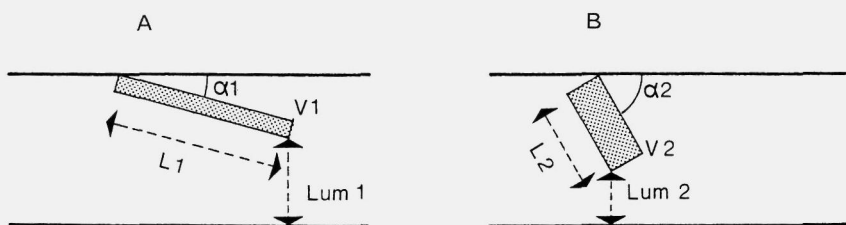
Uitsluiting van dieren vond hoofdzakelijk plaats op grond van technische onvolkomenheden in het snijden van de coupes, waardoor de aorta's microscopisch en morfometrisch niet volledig te bewerken waren en -in veel mindere mate- door direct aan de operatie gerelateerde complicaties. In totaal werden 23 dieren (16%) uitgesloten, waarvan 16 (11.1%) door meettechnische problemen en 7 (4.9%) om operatieve redenen (zie hoofdstuk 5.9). Bij de 1% postoperatieve dood in het onderzoek van Van Aken (1982) dient in aanmerking te worden genomen, dat de dieren niet met aggregatieremmers of anticoagulantia werden behandeld. In het eigen onderzoek overleden 3 dieren (2%), terwijl de overige 4 dieren uitvielen op basis van exclusiecriteria.

Betreffende de morfologie komen de 24-uurs thrombi histologisch volledig overeen met de 24-uurs thrombi in de serie van Van Aken, waarbij met name de gelaagde opbouw van plaatjes en fibrine opvallend was. In de serie waarin de dieren na operatie direct werden opgeofferd, vertoonde de thrombus een "jonger" aspect in de zin van een verschuiving in de verhouding plaatjes-fibrine ten voordele van de plaatjes.

De positie van de flap in het vaatlumen speelt een belangrijke rol in de mate van stenosering, omdat de flap wandstandig of meer centraal in het vat gelegen kan zijn. De positie van de flap komt tot uiting in de gevonden hellingswaarden, namelijk de mate van verkleining van het lumenop-

pervlak door de flap; deze hellingswaarden waren in de controleserie voor de subgroep afsluitende thrombi significant groter dan in de subgroep niet-afsluitende thrombi. In de eerstgenoemde subgroep waren alle flappen (n=9) meer centraal gepositioneerd, in tegenstelling tot de laatstgenoemde subgroep (n=10), waarin slechts drie flappen centraal gelegen waren. De positie van de flap wordt nauwkeurig beschreven door de proximale helling, de ratio volume/lengte van de flap ("dikte") en het minimale lumenoppervlak ter plaatse van de flap, waarmee de maximale stenosering van het vat bepaald is. Tussen beide subgroepen bestaat een significant verschil in de proximale helling, de ratio volume/lengte en het restlumen, hetgeen bepalend blijkt voor de positie van de flap. Dat door deze positie de thrombusreactie wordt bepaald, blijkt uit het feit dat noch de lengte, noch het volume tussen de twee subgroepen verschilde. Dit benadrukt de rol van de haemodynamiek in dit model.

In figuur 27 worden de parameters aan de hand van flappen van gelijk volume in verschillende posities schematisch weergegeven: in A ligt de flap in volledig uitgestrekte positie langs de vaatwand, en in B ligt de flap onder een steilere hoek, opgekruld dan wel meer ineengeschoven.



$$\begin{aligned}
 V_1 &= V_2 \\
 L_1 &= 2L_2 \\
 Lum_1 &> Lum_2 \\
 \alpha_2 &> \alpha_1 \\
 V_1/L_1 &= \frac{1}{2} \cdot V_2/L_2
 \end{aligned}$$

Figuur 27 - Schematische weergave van twee aortaflappen van gelijk volume in verschillende posities.

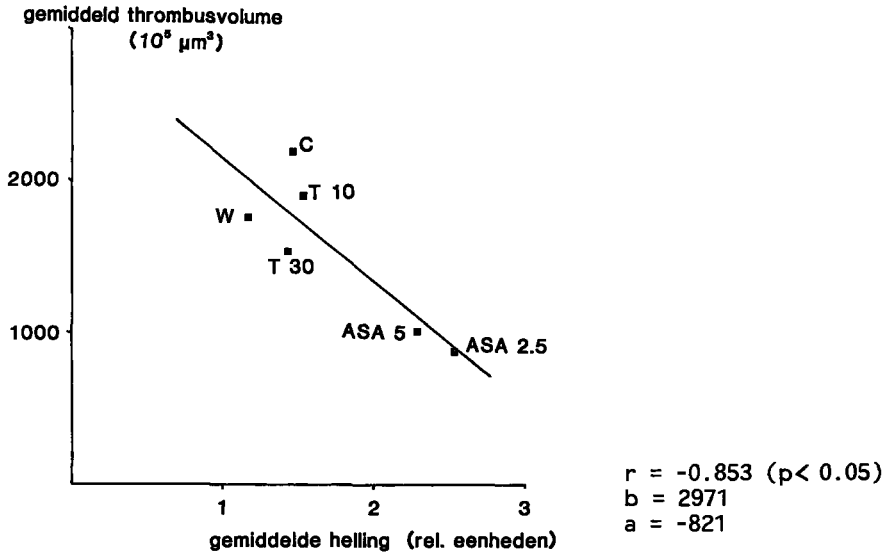
Op basis van de morfometrische en rekenkundige bewerking wordt geconcludeerd, dat afsluitende thrombi veroorzaakt worden door een snel optredende vernauwing ten gevolge van de zich in het aortalumen bevindende flap met een groot volume. Om de mate van invloed van deze parameters op het thrombusvolume te bepalen, werd de niet-afsluitende subgroep uitgebreid met vier dieren uit de afsluitende subgroep, waarvan het thrombusvolume goed meetbaar was, waarna de bovengenoemde variabelen (volume, helling, product van volume en helling) werden geanalyseerd. Bij de stapsgewijze regressieprocedure blijkt het product (Pr) zeer significant gecorreleerd met het thrombusvolume, terwijl het volume alléén eveneens (echter in mindere mate) significant gecorreleerd is. In het multi-pele regressiemodel blijkt alleen het product significant gecorreleerd met het thrombusvolume.

Uit de regressie werd een formule afgeleid, waarmee het thrombusvolume van een flap met een bepaalde helling en een bepaald volume voorspeld kan worden. Om te onderzoeken of de gevonden relatie ook omkeerbaar is en de helling bepaald wordt door de thrombus, zou het volgende gesteld kunnen worden: indien de hellingshoek bepaald wordt door het thrombusvolume, dan zou in groepen met een gemiddeld kleine thrombus (bijvoorbeeld ASA of warfarine) een kleine hellingshoek verwacht kunnen worden. Dit blijkt echter niet het geval omdat de hellingshoek zelfs significant negatief gecorreleerd is met het gemeten thrombusvolume (zie tabel 37 en figuur 28).

Tabel 37 - Gemiddelde helling en thrombusvolume

groep		n	helling	volume*
controles		10	1.47	2193
warfarine		8	1.18	1752
ASA	2.5 mg	8	2.53	869
ASA	5.0 mg	7	2.29	1002
ticlopidine	10 mg	11	1.54	1906
ticlopidine	30 mg	10	1.43	1528

* $10^5 \mu\text{m}^3$



Figuur 28 - Relatie gemiddelde hellingshoek met gemiddeld thrombusvolume.

Bij de later geopereerde controlegroepen van de t-PA-serie blijken het flapvolume en het product kleiner dan in de controlegroepen uit de preventief behandelde series. Een analoge relatie werd eveneens vastgesteld tussen het thrombusvolume en het product, waardoor via regressie een formule ter voorspelling van het thrombusvolume werd afgeleid, die vergelijkbaar is met de formule voor de preventief behandelde series. Het beschreven berekeningsmodel geldt derhalve voor alle na 24 uur opgeofferde controledieren.

Deze relatie wordt ondersteund door de twee, op verschillende tijdstippen geopereerde controleseries, waarin het thrombusvolume via een formule door dezelfde parameters werd voorspeld, zij het dat deze relatie enigszins verschilde. Ook voor de later geopereerde, direct met t-PA behandelde groep en de controlegroep hiervan, blijken de waarden voor het flapvolume alsmede het product kleiner dan voor de controlegroep van de aggregatieremmers. Een relatie tussen het thrombusvolume en de parameters helling en flapvolume of hun product wordt in deze direct na operatie behandelde groepen niet vastgesteld.

In de directe t-PA groep en de controles hiervan blijkt het thrombusvolume, in tegenstelling tot alle na 24 uur opgeofferde series, op basis van de genoemde formule derhalve niet te voorspellen. Het ontbreken van deze relatie is onafhankelijk van het toegediende medicament en is waarschijnlijk gelegen in de zeer korte tijd (enkele minuten) tussen operatie en thrombusvorming, waarin een nog jonge thrombus zich, afhankelijk van onder meer de positie van de flap in het vaatlumen, vormt. De positie van de flap is echter direct na de operatie, bij het nog afwezig zijn van een adhaerente thrombus aan flap en vaatwand, nog niet definitief bepaald. Een aantal malen werd na het afnemen van de aortaklemmen tijdens operatie dan ook gezien, dat de flap zich in de richting van de bloedstroom "ontrolde" en zich na enige tijd definitief positioneerde onder invloed van de inmiddels gevormde thrombus. Men kan zich voorstellen, dat de "flexibele" flap direct na operatie, nog zonder thrombus, in de bloedstroom een golvende beweging maakt, waardoor zeer wisselende schuifkrachten ontstaan en trombocytenaggregaten afwisselend gedeponereerd en weer losgeslagen worden. De jonge thrombus is histologisch namelijk zeer plaatjesrijk, maar heeft nog geen uitgebreide fibrine"ommanteling", waardoor delen van de thrombus onder de sterk wisselende haemodynamische omstandigheden gemakkelijk losraken. Na 24 uur heeft de flap zijn definitieve plaats ingenomen en is de relatie tussen flapstimuli en thrombusreactie gestabiliseerd.

Over de effecten van de parameters proximale helling en volume van de flap kan het volgende worden opgemerkt.

Door middel van de regressievergelijkingen (hoofdstuk 6.4 en 6.5) werd voor alle behandelde groepen en hun controles nagegaan in hoeverre het thrombusvolume bepaald werd door de parameters flapvolume en het product van proximale helling en flapvolume.

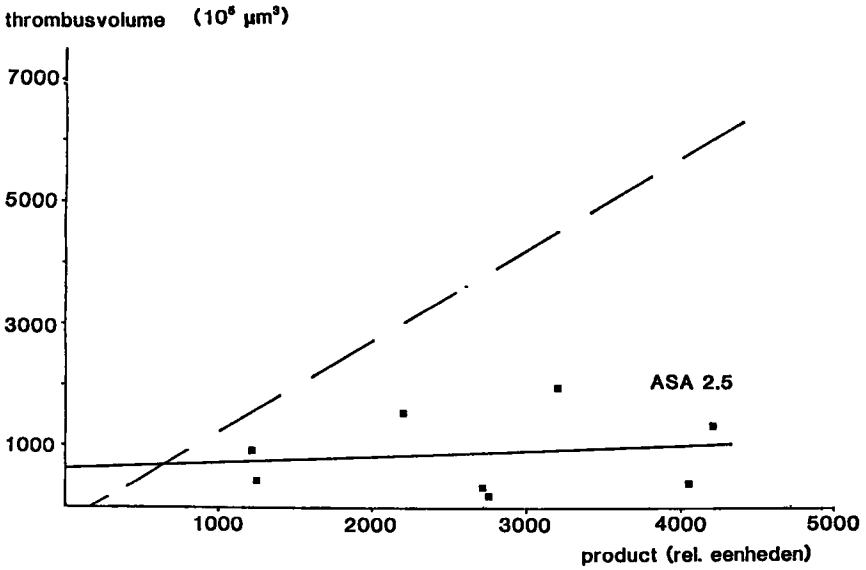
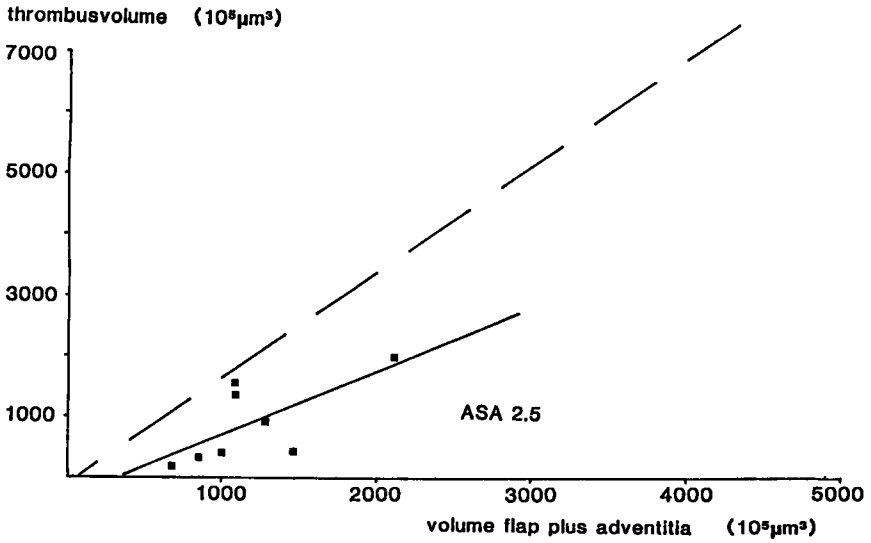
Voor de warfarinegroep bestaat een significante correlatie tussen thrombusvolume en flapvolume alsmede voor het thrombusvolume en het product van helling en flapvolume. Dit medicament heeft dus een algeheel effect, dat wil zeggen dat de invloed van de volumefactor van de flap alsmede het product van de volumefactor en de haemodynamische factor proximale

helling op de thrombusvorming afnemen. In de grafiek (zie figuur 17) ligt de lijn, die de relatie tussen het product en het thrombusvolume weergeeft, vrijwel parallel aan maar significant lager dan die van de controlegroep; de relatie tussen product en volume is derhalve vergelijkbaar, maar het effect van de thrombusprikkel op de thrombusvorming is gereduceerd.

Een mogelijke verklaring voor het effect van warfarine op beide factoren tezamen is, dat plaatjesaggregaten wel ontstaan, maar onder invloed van de antistollingsbehandeling niet door fibrine worden gestabiliseerd en de groei van de thrombus beperkt blijft. De histologische aanwijzingen hiervoor zijn de smalle band van thrombocyten en de zeer kleine hoeveelheid aangekleurd fibrine. Daarnaast speelt de afnemende van het aantal thrombocyten op de dag van opoffering mogelijk een rol door de verminderde snelheid van plaatjesdiffusie en plaatjesadhaesie (zie tabel 6).

In de ASA-groepen bestaat in de groep behandeld met 2.5 mg voor het thrombusvolume een significante correlatie met het flapvolume, die echter niet aanwezig is met het product (van proximale helling en volume) (zie figuur 29). In dit geval verdwijnt de relatie tussen het product en het thrombusvolume, waardoor het thrombusvolume sterk afneemt. Aangezien in de groep behandeld met 5.0 mg noch in de regressie op het product, noch in de regressie op het volume een significante correlatie wordt gevonden, kan over de invloed van deze parameters bij deze dosis geen uitspraak worden gedaan.

De restthrombose, histologisch bestaande uit een smalle band thrombocytenaggregaat en een kleine hoeveelheid gelocaliseerd fibrine, wordt verklaard door het effect van de factor flapvolume, terwijl het effect van de proximale helling van de flap onder invloed van ASA verdwijnt. Deze bevindingen komen overeen met die van Folts et al. (1982), die aantoonde, dat zich aggregaten vormden op een met intact endotheel beklede focale stenose in een arterie en dat deze aggregaten juist onder invloed van ASA niet meer optraden. Het effect van de flap op het thrombusvolume wordt in alle gevallen verklaard door de sterke thrombogene prikkel, uitgaande van de media en adventitia van de flap.



Figuur 29 - De relaties van volume flap plus adventitia met thrombusvolume en het product met thrombusvolume voor de groep ASA 2.5 mg.

Voor beide ticlopidinegroepen werd noch voor het flapvolume alleen, noch voor het product van flapvolume en proximale helling een correlatie met het thrombusvolume vastgesteld. Ondanks het niet significante verschil in het optreden van afsluitende thrombi tussen de controlegroep (9/19) en de behandelde groepen (10 mg: 3/14; 30 mg: 2/12), is echter een duidelijke tendens ten voordele van de behandelde groepen aanwezig.

Aangezien het effect van ticlopidine dosisafhankelijk is, kan het uitblijven van effect in deze groepen gelegen zijn in de relatief lage dosering. Histologisch lijkt de hoeveelheid fibrine in de thrombus geringer dan in de controlegroep, terwijl de thrombocytenaggregaten in beide groepen wèl vergelijkbaar waren.

In de literatuur wordt in verschillende onderzoeken met wisselende doseringen (30 tot 500 mg/kg/dag) remming van thrombusvorming verkregen (hoofdstuk 3.4). In het algemeen betrof het experimenten met een waarschijnlijk minder sterke thrombogene prikkel dan in het aortaflapmodel. Onder invloed van ticlopidine 100 mg/kg, constateerde Van Aken (1982) na 24 uur meer dan 50% thrombusremming op de flap. In de eigen studie lijken de lagere doseringen (10 en 30 mg/kg/dag) onvoldoende om een thrombusremmend effect te kunnen bewerkstelligen.

In de t-PA series blijkt zowel in de directe t-PA serie als in de controles geen correlatie te bestaan tussen het thrombusvolume en het product (helling x volume) of het volume. Een mogelijke verklaring hiervoor werd reeds gegeven.

In de 24-uurs controleserie bestaat een significante correlatie tussen het product en het thrombusvolume. Met zowel de lage als de hoge dosis t-PA wordt geen afneming van het thrombusvolume bereikt. Bij histologische vergelijking valt op, dat de thrombi in de direct met t-PA behandelde groep een zeer geringe hoeveelheid fibrine vertonen, terwijl in de controlegroep sprake is van een sterk wisselende hoeveelheid fibrine. In de thrombi van de na 24 uur met t-PA behandelde groepen was opmerkelijk weinig fibrine aanwezig alsmede een in grootte wisselend thrombocytenaggregaat.

In tegenstelling tot bij de directe t-PA serie, waarbij de ineffectiviteit van het middel op het thrombusvolume mogelijk te wijten is aan de wis-

selende haemodynamiek enerzijds en de heftige thrombogene prikkel anderzijds, is de oorzaak van het uitblijven van effect op de na 24 uur behandelde groep niet duidelijk. Met de hoge dosis wordt in het algemeen wel effectieve thrombolysen bereikt van veneuze en verse arteriële thrombi. De gemiddelde waarden van de proximale helling, het flapvolume en hun product wijken niet af van de gevonden waarden bij de preventief en de direct met t-PA behandelde dieren. Een verschuiving van thrombi uit het gebied met afsluitende thrombi naar dat van de niet-afsluitende, grote thrombi, waardoor relatief grote thrombi zouden worden gemeten met als gevolg een relatieve onderschatting van het behandelingseffect, is derhalve niet waarschijnlijk. Mogelijk is de uitval wegens microscopische ongeschiktheid in de groep behandeld met de hoge dosis t-PA bepalend voor het feit, dat geen statistisch significante resultaten worden bereikt; op basis van het gemiddelde en de spreiding van het thrombusvolume, lijkt in deze (weliswaar kleine) groep echter toch een zeker effect te bestaan (zie tabel 35).

Het is merkwaardig, dat in de beide behandelde groepen na 24 uur (n=18) 4 afsluitende thrombi worden gezien en in de controlegroep slechts 1 (n=14), terwijl in de ASA-groepen tezamen (n=16) eveneens slechts 1 afsluitende thrombus wordt aangetroffen. Een operationele of microscopische verklaring hiervoor kon bij geen van de dieren worden vastgesteld.

Terwijl t-PA in verschillende experimenten een groot thrombolytisch vermogen blijkt te hebben en de directe waarde in verschillende onderzoeken betreffende de thrombolysen bij het myocardinfarct heeft bewezen, wordt in dit model hiervan geen statistisch significant effect gevonden. Een verklaring hiervoor ligt noch op basis van de toedieningsweg, noch op basis van de dosering voor de hand. Het is bekend, dat de halfwaardetijd van t-PA in plasma bij de rat zeer kort is (ongeveer 1 minuut); de activiteit in de thrombus blijft echter aanzienlijk langer aanwezig, zodat in het algemeen een sterke thrombusgekoppelde fibrinolyse optreedt.

Wat betreft de samenhang met de vaatchirurgie werd, naast de reeds genoemde morfologische overeenkomsten tussen dit model en vasculaire pathologie, de medicamenteuze beïnvloeding van thrombose op korte termijn (24 uur) bestudeerd. Ter verkrijging van een onmiddellijk effect,

werd de preventieve medicatie twee dagen vòòr operatie ingesteld; getuige de normotestwaarden voor de warfarinegroep was de farmacologische werking ten tijde van de operatie voldoende aanwezig (zie tabel 5).

In dit onderzoek werd de beïnvloeding van thrombosering van autoloog materiaal (behoudens het gebruik van niet-thrombogene prolene) bestudeerd. Een uitspraak over het effect van de medicatie op prothesemateriaal kan op basis van dit model echter niet worden gedaan; wel bestaan in de literatuur sterke aanwijzingen voor thrombusremming onder invloed van zowel ASA als warfarine bij patiënten met vaatprothesen.

Zowel bij reconstructies in de humane situatie als in het aortaflapmodel speelt de haemodynamiek een belangrijke rol in de mate waarin thrombosering optreedt. Deze factor kan in het flapmodel gekwantificeerd worden door de snelheid van stenosering en daardoor de mate waarin de bloedstroomsnelheid wordt beïnvloed. Bij voldoende afneming van deze snelheid vindt volledige thrombosering plaats, waarvan het effect uiteraard nog eens wordt versterkt door de thrombogene activiteit van de flap zelf. In de warfarinegroep blijft de relatie van het product met het thrombusvolume intact, maar is het effect van de prikkel minder dan in de controlegroep. Deze bevinding lijkt overeen te stemmen met de klinische bevindingen van Kretschmer et al. (1986), die bij patiënten met een ernstige claudicatio (Fontaine III-IV) een positieve invloed van anticoagulantia vaststelden op de doorgankelijkheid van vaatreconstructies. Dit effect werd verklaard door de beïnvloeding van de doorstroming van vaten met meerdere stenosen, een lage bloedstroomsnelheid, een hoge perifere weerstand en een door atherosclerose veroorzaakte hoge thrombogeniciteit. Met laag gedoseerd ASA vervalt de relatie tussen thrombusprikkel en thrombusvolume en wordt, onafhankelijk van de prikkel, een gelijke restthrombose gevonden, zodat van een sterk thrombusremmend effect gesproken kan worden.

In meerdere studies werd de thrombogeniciteit van de verschillende vaatprothesen als oorzaak van occludering benadrukt, waarbij ASA (eventueel gecombineerd met dipyridol) de vroege plaatjesaccumulatie verminderde en de doorgankelijkheid op korte termijn verhoogde. Deze thrombogeniciteit wordt uiteraard bepaald door het gebruikte materiaal, de operatietechniek, de perifere weerstand (als resultante van de anatomie van het

vaatbed), de rheologie en de stollings- en aggregatieneiging van het bloed.

Zowel in de studie van Van Aken (1982) als in de eigen studie vormen zich direct na operatie grotere thrombi op de flap dan de thrombi die later worden aangetroffen. In de eigen studie werd 24 uur postoperatief onder invloed van ASA (2.5 mg) en warfarine een reductie van de thrombusvolumina vastgesteld, hetgeen overeenkomt met de resultaten van Kester et al. (1984), Donaldson et al. (1985), McCollum et al. (1985) en Cleyne et al. (1987), die vaststelden dat de doorgankelijkheid van vaatplastieken sterk correleerde met de mate van plaatjesaccumulatie direct na het inbrengen van een (op zich thrombogene) vaatprothese.

Op basis van het hier gepresenteerde onderzoek kan geen uitspraak worden gedaan over de medicamenteuze thromboseremming op langere termijn. Wel zou gesteld kunnen worden dat, indien de 24-uurs thrombi qua volume kunnen worden gereduceerd, de later georganiseerde, thrombi ook kleiner zullen zijn, hetgeen de doorgankelijkheid van vaatplastieken op lange termijn kan bevorderen. Deze stelling zou echter bewezen moeten worden door een studie naar de effecten van ASA, warfarine en ticlopidine (de laatste in een hogere dosering) op lange termijn.

De thrombi in het flapmodel komen histologisch overeen met de thrombi op een slecht uitgevoerde arteriële anastomose of in een gedesobstrueerd vaatsegment en kunnen kwantitatief voorspeld worden door de gevonden relatie tussen de haemodynamische parameter (proximale helling) en de thrombogene massa (parameter flapvolume). Deze bevindingen benadrukken de gelijkenis tussen dit aortaflapmodel en vaatchirurgische plastieken enerzijds en de geschiktheid van dit model om het effect van farmaca te kwantificeren anderzijds. In de literatuur werd tot op heden nog geen model beschreven, dat aan bovengenoemde voorwaarden voldoet.

HOOFDSTUK 8 - CONCLUSIES

1. Op basis van thrombogeniciteit en haemodynamiek vertoont het aortaflapmodel theoretisch grote gelijkenis met humane thrombusvorming, zoals die gezien wordt bij een door omstandigheden beperkte vaat-chirurgische techniek bij een arteriële anastomose of een endarteriectomie. Wat betreft de twee bovengenoemde factoren, is dit model derhalve zeer geschikt voor het testen van farmaca, die de humane thrombusvorming kunnen beïnvloeden.
2. In het aortaflapmodel leidt morfometrie van aorta, flap en thrombus tot nauwkeurige kwantitatieve bepaling van deze structuren en maakt, na combinatie, statistische bewerking en interpretatie van de metingen mogelijk.
3. Op basis van de parameters flapvolume en proximale helling (de mate waarin het oppervlak van het vaatlumen onder invloed van de flap per lengte-eenheid afneemt) kan het thrombusvolume na 24 uur worden voorspeld.
4. In het aortaflapmodel neemt het aantal afsluitende thrombi af onder invloed van zowel aggregatieremming met acetylsalicylaat als antistolling met warfarine.
5. Het thrombusvolume neemt significant af onder invloed van warfarine, waarbij de relatie met het product van de parameters flapvolume en proximale helling blijft bestaan.
6. Onder invloed van laag gedoseerd acetylsalicylaat (2.5 mg/kg/dag) neemt het thrombusvolume in het aortaflapmodel significant af, waarbij geen correlatie meer gevonden wordt tussen thrombusvolume en het product van de parameters flapvolume en proximale helling.

7. In het aortaflapmodel kan onder invloed van ticlopidine (10 en 30 mg/kg/dag) of weefseltype-plasminogeenactivator geen significante afneming van het thrombusvolume worden aangetoond.

8. Op basis van de histologische bevindingen alleen, zou gesteld kunnen worden, dat de trombocytenuitstroomingen in de acetylsalicylaat- en warfarinegroepen kleiner zijn dan in de andere groepen en dat weinig fibrine aangetroffen wordt in de met acetylsalicylaat, warfarine en weefseltype-plasminogeenactivator behandelde groepen.

HOOFDSTUK 9 - SAMENVATTING

In de literatuur bestaat nog steeds geen consensus over het gebruik c.q. het effect van antithrombotische medicatie. In hoofdstuk 1 (de inleiding) wordt het belang benadrukt van een met de humane situatie overeenkomend in vivo arteriële thrombosemodel voor de bestudering van het effect van deze medicatie.

In dit kader wordt het aortaflapmodel bij de rat beschreven. Door de aanwezigheid van een thrombogene stenose in een pulsatiele bloedstroom enerzijds en de overeenkomst met de humane thrombi anderzijds is dit model geschikt om het effect van geneesmiddelen, zoals ASA, ticlopidine, warfarine en weefselplasminogeenactivator, te onderzoeken en vervolgens te kwantificeren.

In hoofdstuk 2 worden zowel de rol van de plaatjes, de invloed van stolling, fibrinolyse en vaatwand als de fysische invloed van de bloedstroom bij arteriële thrombose besproken. Hoewel deze factoren bij een thrombotisch proces moeilijk los van elkaar te beschouwen zijn, is het voor de begripsbepaling noodzakelijk dit proces te ontleden en te beschrijven. Juist dan is het mogelijk de effecten van geneesmiddelen, die de "thrombose-cascade" op verschillend niveau beïnvloeden, te evalueren. De correlatie tussen het aortaflapmodel en arteriële thrombose wordt benadrukt op basis van de gemeenschappelijke rol van plaatjes, stolling, fibrinolyse, vaatwand en bloedstroom.

In hoofdstuk 3 wordt de keuze van de experimenteel gebruikte farmaca verantwoord. Vervolgens wordt voor elk van de geteste middelen een experimenteel en klinisch overzicht gegeven.

- De keuze van ASA als plaatjesremmer berust op de irreversibele remming van het cyclooxygenase, waardoor geen thromboxaan A_2 meer gevormd kan worden. Hierbij dient echter opgemerkt te worden, dat het effect van ASA tweeledig is, namelijk remming van de synthese van het plaatjesaggregatie-inducerende thromboxaan A_2 enerzijds en remming van de aggregatieseremmende prostacyclinesynthese anderzijds, hetgeen geleid heeft tot het zogenaamde "Aspirine-dilemma".

Gebaseerd op de dosering en de duur van het ASA-effect, de gevoeligheid van endotheel en plaatjes alsmede de salicylaatinteractie en de farmacokinetiek, wordt een literatuuroverzicht gegeven van de resultaten van experimenteel onderzoek naar het effect van ASA. Op basis van bovengenoemde factoren kan een dissociatie van het remmend effect op plaatjes en endotheel slechts ten dele worden bereikt.

Inzicht in de farmacokinetiek van ASA maakt duidelijk, dat de thromboxaanproductie in de plaatjes reeds in de praesystemische (portale) circulatie wordt geremd en dat de prostacyclineproductie, na deacetylering van ASA in de lever, in de systemische circulatie beschermd wordt door een lage effectieve dosis ASA. Om deze reden wordt opname van ASA in de systemische circulatie door een lage orale dosis ASA beperkt en ontstaat een grotere selectiviteit van ASA. Deze selectiviteit kan mogelijk nog vergroot kan worden door toediening van salicylaat, dat zelf geen remmend effect heeft op het cyclooxygenase, maar het effect van ASA op met name het vaatwandcyclooxygenase voorkomt door een dosisafhankelijke remming.

Aansluitend wordt een klinisch overzicht gegeven van de grote, dubbelblind gerandomiseerde ASA-studies bij het myocardinfarct, de cerebrovasculaire ziekten en bij claudicatio intermittens.

- De werking van ticlopidine wordt verklaard door de inductie van een functionele deficiëntie van een glycoproteïnecomplex op het plaatjesmembran, als gevolg waarvan de fibrinogeenbinding wordt geblokkeerd. De werking is dosisafhankelijk en treedt op door een (nog) onbekende metaboliet van ticlopidine. In een experimenteel overzicht blijkt ticlopidine in doseringen hoger dan 100 mg/kg/dag de thrombusvorming in een groot aantal modellen selectief te remmen. In de literatuur zijn de klinische ervaringen met ticlopidine bij het myocardinfarct, de cerebrovasculaire ziekten en claudicatio intermittens zeer beperkt voorhanden.

- De werking van warfarine wordt uiteengezet en er wordt een experimenteel overzicht gegeven. Hierbij valt op, dat tot op heden (merkwaardig genoeg) weinig experimenteel onderzoek naar de effecten van anticoagulantia bij arteriële thrombose is gedaan. Tevens wordt de klinische literatuur besproken, waarbij zowel de mate als de intensiteit van de antistolling essentieel blijkt. Behandelingsresultaten blijken alleen bereikt

te worden bij adequate dosering, zoals van de Sixty Plus Reinfarction Study Group bij de secundaire preventie van het myocardinfarct. In tegenstelling tot bij patiënten met TIA's, blijkt bij patiënten met claudicatio intermittens een goede indicatie te bestaan voor langdurig gebruik van anticoagulantia.

- Een overzicht van de recente studies naar het effect van weefsel-type-plasminogeenactivator (t-PA), laat zeer positieve resultaten zien bij de behandeling van het acute myocardinfarct en (in beperkte mate) gethromboseerde perifere arteriën en vaatplastieken. Daar de indicatie voor behandeling bij de twee laatstgenoemde nog niet duidelijk is, wordt een aantal toepassingsmogelijkheden gesuggereerd.

In hoofdstuk 4 worden de eigenschappen van het aortaflapmodel getoetst aan de voorwaarden die gesteld worden aan een arteriële thrombosemodel en worden de overeenkomsten tussen dit model en de humane thrombusvorming beschreven.

Tevens wordt de samenhang van het model met de vaatchirurgie uiteengezet; het op korte termijn falen van vaatreconstructies door thrombose is vooral afhankelijk van de instrumentele behandeling, de aard van de gebruikte materialen en de bloedstroomsnelheid. Zowel de vroege als late doorgankelijkheid van vaatplastieken is gecorreleerd aan de mate van thrombose direct na de ingreep. Aangezien de capaciteit en de perifere weerstand van het distale vaatbed niet kunnen worden beïnvloed, is het noodzakelijk om de effecten van thrombose remmende middelen vast te stellen bij vaatreconstructies. Het flapmodel voldoet aan de experimenteel vereiste intrinsieke consequenties van een vaatchirurgische reconstructie in de zin van de veranderingen in de haemodynamiek, het vrijkomen van weefselthromboplastines en de beïnvloeding van de locale samenstelling van het bloed door plaatjes- en stollingsactivatie.

In hoofdstuk 5 worden de dosering van de geteste middelen, de uitgevoerde operatie, het opofferen van de proefdieren alsmede de histologische bewerking van de aorta's besproken. De morfometrische oppervlaktemetingen en de volumebepaling van de thrombi worden uiteengezet en tevens wordt een overzicht gegeven van de behandelingsschema's.

Voor analyse werden 7 ratten (4.9%) uitgesloten wegens operatieve fouten en (in de warfarineserie) twee verbloedingen. Bij microscopie bleken 16 dieren (11.9%) ongeschikt voor verdere analyse door niet-meetbare series coupes. Na onderlinge histologische vergelijking van de met ASA, ticlopidine, warfarine en t-PA behandelde groepen alsmede van de controle-groepen werd geconcludeerd, dat in de ASA- en warfarinegroepen een kleiner trombocytenuitlosgaande aggregaat aanwezig was en dat met name in de ASA-, warfarine- en t-PA-groepen minder fibrine aanwezig was. Als voorbeeld wordt aan de hand van één proefdier (rat 148) de rekenkundige volumebepaling vanuit de microscopie beschreven en grafisch geïllustreerd. Uit deze grafische weergave kan een belangrijke haemodynamische parameter, de zogenaamde proximale helling van de flap (flap plus adventitia), worden afgeleid. Deze proximale helling is een maat voor de snelheid van stenoserend van het aortalumen door de flap.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten besproken. Uit analyse van de controlegroep blijkt het product van twee parameters van de aortaflap, de snelheid van lumenvernauwing (proximale helling) en het volume van de flap, bepalend voor het gemeten thrombusvolume. Uitgaande van de gemeten parameters, kan voor iedere rat het te verwachten thrombusvolume worden berekend. Behandeling met ASA of warfarine vermindert het aantal te verwachten afsluitende thrombi significant, terwijl onder invloed van ticlopidine sprake is van een tendens tot afneming van het aantal afsluitende thrombi; voor de genoemde groepen kan dit niet worden verklaard op basis van verschillen in de thrombogene prikkel tussen de groepen.

Behandeling met warfarine en ASA 2.5 mg/kg leidt tot een significante vermindering van het thrombusvolume, hetgeen voor de ASA 5.0 mg/kg groep alleen geldt indien deze wordt gecombineerd met de ASA 2.5 mg/kg groep. In geen van de ticlopidinegroepen wordt een significant effect op de thrombusgrootte gevonden. In de direct met t-PA behandelde groepen en hun controles blijkt geen significante correlatie aanwezig tussen thrombusgrootte en het product van flapvolume en proximale helling; het gehanteerde berekeningsmodel kan derhalve in de direct behandelde groep niet worden toegepast. Na analyse blijkt geen verschil in thrombusvolume tus-

sen de behandelde groep en de controlegroep. Voor de controlegroep van de 24 uur na operatie met t-PA behandelde groepen blijkt daarentegen wèl een analoge, significante correlatie tussen het bovengenoemde product en het thrombusvolume, zij het dat de regressieformule verschillend is van die voor de plaatjesaggregatieremmende middelen en anticoagulantia. Dit verschil wordt toegeschreven aan de toegenomen ervaring met de flapoperatie, waardoor de volumina van de flap en het product kleiner waren dan in de eerdere geopereerde groepen. De thrombusvolumina van de met lage (6750 IU/kg) en hoge (45000 IU/kg) doses t-PA behandelde dieren blijken niet significant te zijn afgenomen, hoewel de laatstgenoemde groep wel een sterke tendens vertoont tot afnemning van het thrombusvolume.

In hoofdstuk 7 (de discussie) worden de resultaten aan de hand van de bepalende parameters besproken. In tegenstelling tot andere experimentele modellen, blijkt de haemodynamiek in het aortaflapmodel essentieel en kan de factor proximale helling uit de morfometrische metingen worden afgeleid.

Op basis van de genoemde parameters proximale helling en flapvolume kan het thrombusvolume in de beide 24-uurs controleseries worden voorspeld. Voor de direct met t-PA behandelde groep en de controles blijkt het echter niet mogelijk een formule af te leiden, omdat zeer kort na operatie een zeer onstabiele, jonge thrombus op de flap wordt aangetroffen en de flap zijn definitieve positie in het vaatlumen nog niet heeft ingenomen. In de met warfarine en ASA 2.5 mg/kg behandelde groepen neemt het thrombusvolume af; onder invloed van ASA 5.0 mg/kg wordt dit effect alleen in combinatie met ASA 2.5 mg/kg vastgesteld.

In dit sterk thrombogene model heeft ticlopidine, mogelijk ten gevolge van de lage dosering (10 en 30 mg/kg), geen effect. In geen van de met t-PA behandelde groepen wordt een significante afnemning van het thrombusvolume aangetoond, hetgeen niet kan worden verklaard op basis van de dosering of de toedieningsweg. Het feit, dat de afnemning van het thrombusvolume in de hoog gedoseerde t-PA-groep niet significant wordt, kan mogelijk verklaard worden door de te kleine resterende groep ten gevolge van uitsluiting van 4 van de 10 dieren op basis van microscopische criteria.

Uit de literatuur blijkt de doorgankelijkheid van vaatplastieken sterk gecorreleerd met het optreden van vroege thrombose. Op basis van de theoretische gelijkenis van het aortaflapmodel met de intrinsieke consequenties verbonden aan vaatplastieken en de morfometrisch gekwantificeerde analyse van de flapparameters met het daarvan afgeleide thrombusvolume, is dit model bij uitstek geschikt om het effect van medicamenteuze behandeling vast te stellen.

De mogelijkheid om het volume van vroeg optredende thrombi te beperken kan ertoe leiden, dat het volume van later optredende thrombi eveneens wordt gereduceerd. Op deze wijze kan mogelijk de doorgankelijkheid van vaatreconstructies op lange termijn worden verhoogd.

In hoofdstuk 8 worden de conclusies van het onderzoek nog eens samengevat.

In literature, there is still no consensus on the use or effects of anti-thrombotic drugs. In order to study the effects of these drugs, chapter 1 (the introduction) emphasizes the importance of an in-vivo model for arterial thrombosis, which is similar to the human situation. Against this background, a microsurgical model for arterial thrombosis in rat aorta, "the aortic flap model", is described. The presence of a thrombogenic stenosis in a pulsatile blood flow, combined with the similarity to human pathology, make this model suitable for testing and subsequent quantifying the effects of drugs like acetylsalicylic acid, ticlopidin, warfarin and tissue plasminogen activator.

Chapter 2 describes the role of the platelets, the coagulation and the fibrinolytic system as well as the vessel wall and the influence of the blood flow in arterial thrombosis. In order to understand the thrombotic process, these factors are viewed and described separately, enabling us to evaluate the effects of the various drugs that influence the "thrombosis cascade" at different levels. The correlation between the aortic flap model and the thrombotic process is stressed with reference to the interrelated role of the platelets, the coagulation and fibrinolytic system, the vessel wall and the blood flow.

In chapter 3, the selection of the drugs tested in the experimental model is accounted for. Subsequently, an experimental and clinical review is given of each of the tested drugs.

- Platelet-inhibiting acetylsalicylic acid (ASA) irreversibly inhibits cyclooxygenase, thus suppressing the formation of thromboxane A_2 . However, the effect of ASA is contradictory: by inhibiting the formation of thromboxane A_2 , ASA suppresses platelet aggregation, but by simultaneously inhibiting the prostacyclin production, ASA enhances platelet aggregation, thereby creating the so-called the "aspirin dilemma".

A survey is presented of the experimental studies on the effect of ASA, with reference to the dosage, the duration of the effect, the sensitivity of the endothelium and the platelets as well as the salicylate interaction

and the pharmacokinetics. Based on the above-mentioned factors, dissociation of the inhibitory effect on platelets and endothelium is only partially possible.

Study of the pharmacokinetics of ASA makes it clear, that the thromboxane production in platelets is already inhibited in the presystemic (portal) circulation, and that (after deacetylation of ASA in the liver), the prostacyclin production in the systemic circulation is protected by a low effective dose of ASA. Therefore, low oral dosage of ASA reduce of the uptake into the systemic circulation, resulting in a greater selectivity of ASA. This may be further enhanced by administering salicylate, that itself exerts no inhibitory effect on cyclooxygenase because salicylate particularly prevents the effect of ASA on the vessel wall cyclooxygenase by dose-dependent inhibition.

Subsequently, a clinical review is presented of the large-scale, double-blind studies of ASA in myocardial infarction, cerebrovascular diseases and intermittent claudication.

- The effect of ticlopidin is explained by induction of a functional deficiency of a glycoprotein complex on the platelet membrane, blocking the binding of fibrinogen. This effect is dose-dependent and is due to an (as yet) unknown metabolite of this drug. The experimental review shows that ticlopidin in a dosage exceeding 100 mg/kg/day selectively inhibits thrombus formation in a large number of models. Until now, only limited data on clinical experience with this drug in myocardial and cerebral infarction as well as in claudication are found in the literature.

- The effect of warfarin is analysed by reviewing the experimental work. It appears, that (curiously enough) there have so far been few experimental studies on the effect of anticoagulants in arterial thrombosis. Discussion of the clinical literature shows, that the extent as well as the intensity of anticoagulation are essential. It appears, that therapeutic results are only achieved by an adequate dosage as was used by the Sixty Plus Reinfarction Study Group for Secondary Prevention of Myocardial Infarction. Unlike TIAs, intermittent claudication proves to constitute an indication for protracted use of anticoagulants.

- The review of recent (limited) data on the use of tissue plasminogen

activator (t-PA) shows very positive results in the treatment of myocardial infarction as well as in thrombosis of peripheral arteries and vascular reconstructions. Since the indication for treatment in the latter category has not yet been clearly defined, some possible applications are suggested.

In chapter 4, the similarity of the characteristics of the aortic flap model to the conditions required of an experimental model for arterial thrombosis are described and compared with human thrombus formation. The relation of this model to vascular surgery is discussed because early failure of vascular reconstructions by thrombosis mainly depends on instrumental handling, the materials used and the flow rate of the blood. Both early- and long-term patency of reconstructed vessels are correlated with the degree of immediately postoperatively developing thrombosis. Since the capacity and the peripheral resistance of the distal arteries can not be corrected, it is necessary to assess the effects of antithrombotic drugs in vascular reconstructions. The aortic flap model meets the experimentally required intrinsic consequences of a vascular reconstruction by creating haemodynamic changes, release of tissue thromboplastins as well as by activating the platelets and the coagulating system, thus influencing the local blood composition.

In chapter 5, the dosage of the drugs tested is discussed as well as the surgical technique, the method of sacrifice and the subsequent histological processing of the aorta's.

The morphometric surface measurements and the volume determinations of the thrombi are described, and a survey is presented of the treatment schedules.

Seven rats (4.9%) were excluded because of five surgical mistakes and (in the warfarin series) two fatal haemorrhages. At microscopical examination, 16 animals (11.9%) proved unsuitable for further analysis because of non-measurable serial sections. The histological findings in the groups treated with ASA, ticlopidin, warfarin and t-PA as well as the control groups are compared, leading to the conclusion, that the platelet aggregates in the ASA and warfarin groups are smaller and that less fibrin was

present in the ASA, warfarin and t-PA groups.

As an example, the volume calculation for one animal (rat 148) based on the microscopical findings is made and graphically illustrated. From this graphical representation, an important haemodynamic parameter, the so-called proximal slope of the flap (plus adventitia), can be deduced and is considered to be an indicator of the rate at which the aortic lumen is narrowed by the flap.

In chapter 6, the results are described. Analysis of the control group shows, that the product of two parameters of the aortic flap -the rate of luminal stenosis (proximal slope) and the volume of the flap (plus adventitia)- determines the volume of the thrombus. Based on measuring these parameters, the expected thrombus volume is calculated for all treated animals. ASA and warfarin significantly decrease the number of expected occlusive thrombi, while a positive trend is found in the ticlopidin group; this result cannot be explained by the differences in thrombogenous stimuli between the groups.

Analysis of the warfarin and ASA 2.5 mg/kg groups results in a significant decrease of the thrombus volume as did the ASA 5.0 mg/kg group only when combined with the ASA 2.5 mg/kg group. The groups treated with ticlopidin show no significant effect on the thrombus volume. In the groups treated with t-PA immediately after operation as well as their controls, no significant correlation is found between the thrombus volume and the two above-mentioned parameters. As a result, the calculation model can not be applied to these groups. Analysis shows no difference in thrombus volume between the treated and the control groups. For the control group of the animals treated with t-PA 24 hours postoperatively, on the other hand, an analogous, significant correlation between the thrombus volume and the product of the two above-mentioned parameters proves to exist, although the regression formula is different from the controls of the groups treated with platelet inhibitors and anticoagulants. This difference is attributed to the growing experience with the flap operation, which causes the volumes of the flap (plus adventitia) and thus the product to be smaller than in the groups operated earlier. The thrombus volumes of the animals treated with t-PA in low (6750 IU/kg) and in high (45000 IU/kg) doses did not prove to decrease significantly,

although there is a strong tendency towards a reduction of the thrombus volume in the latter group.

In chapter 7, the results are discussed with reference to the determining parameters. Unlike in other experimental models, the haemodynamics in the aortic flap model are essential, and this factor (proximal slope) can be deduced from the morphometric measurements. Based on the parameters mentioned, the size of the thrombus can be predicted in the two 24-hour control series. For neither t-PA group tested immediately after operation nor its controls, such a formula can be deduced. This is explained by the very short interval between operation and sacrifice, when the flap with a highly unstable young thrombus has not positioned itself definitively in the vessel lumen.

In the warfarin and ASA 2.5 mg/kg groups, the thrombus volume is significantly decreased; for the ASA 5.0 mg/kg group a significant decrease is only present in combination with the ASA 2.5 mg/kg group. In this highly thrombogenic model, ticlopidin has no significant effect on the thrombus volume, possibly because of the relatively low dosage (10 and 30 mg/kg) when compared to other experimental studies. In all t-PA groups a significant effect cannot be demonstrated, which can neither be attributed to the dosage nor to the method by which the drug was administered. The fact, that the thrombus volume in the highly dosed t-PA group is not significantly reduced, might be explained by the relatively small group as a result of exclusion of 4 out of 10 animals.

A review of the clinical studies in the literature shows, that the patency of vascular reconstructions is strongly correlated with the development of early thrombosis. In view of the similarity of the aortic flap model to the intrinsic consequences of vascular reconstructions as well as the morphometrically quantified analysis of the flap parameters and the thrombus volume deduced from the latter, this model is eminently suited for determining the effect of drug treatment. The possibility to reduce the volume of early thrombi may consequently result in influencing the volume of late thrombi, thereby possibly increasing the long-term patency of vascular reconstructions as well.

In chapter 8, the conclusions from this study are summarized.

HOOFDSTUK 11 - REFERENTIES

AIMS-trial study group

Effect of intravenous APSAC on mortality after acute myocardial infarction: preliminary report of a placebo-controlled clinical trial. *Lancet*, March 1988: 545-549

Aken van P.J.

Experimental arterial thrombosis. Investigations based on a new microsurgical model for arterial thrombosis in rat aorta. Thesis, Leiden 1982

Aken van P.J., Emeis J.J.

Organisation of experimentally induced arterial thrombosis. The first six days. *Artery* 1982, 11 (2): 156-175

Albert J.P. et al.

Rezidivprophylaxe operativ korrigierten Arterienverschlüsse der unteren Extremitäten. *Med. Welt* 1982, 33, 50: 1829-1830

American Canadian Cooperative Study Group

Persantin-aspirin trial in cerebral ischaemia. *Stroke* 1985, 16: 406-415

Archie J.P. et al.

Critical stenosis of the internal carotid artery. *Surg.* 1981, 89 (1): 67-72

Arfors K.E. et al.

Platelet response to laser-induced microvascular injury in the rabbit mesentery and the rabbit ear chamber. *Thromb. Res.* 1973, 3: 75-85

Ashida S.I., Abiko Y.

Mode of action of ticlopidine in inhibition of platelet aggregation in the rat. *Thromb. Haemost.* 1979, 2, 41: 436-449

Ashida S.I. et al.

Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral occlusive disease in rats. *Thromb. Res.* 1980, 18: 55-67

Aspirin Myocardial Infarction Study Research Group

A randomized, controlled trial of aspirin in persons recovered from myocardial infarction. *JAMA* 1980, 243 (7): 661-669

Astrup T., Coccheri S.

Thromboplastic and fibrinolytic activity of the arteriosclerotic human aorta. *Nature* 1962, 193: 182

- Astrup T.
 Fibrinolysis: an overview.
 In: Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis.
 J.F. Davidson et al.
 Raven Press, New York 1978: 1-57
- Aukland A. et al.
 Platelet inhibition with ticlopidine in atherosclerotic intermittent claudication.
 J. Clin. Path. 1982, 35: 740-743
- Australian Coronary Thrombolysis Group
 Coronary thrombolysis and myocardial salvage by tissue plasminogen activator given up to 4 hours after onset of myocardial infarction.
 Lancet, January 1988: 203-208
- Baak J.P.A., Oort J.
 A manual of morphometry in diagnostic pathology.
 Springer Verlag 1983
- Baeckeland E.
 Etude de la récanalisation sous traitement anticoagulant des artères thrombosées expérimentalement.
 TDH 1959: 387-403
- Barlow G.H., Lazer L.
 Characterisation of the plasminogen activator isolated from human embryo kidney cells: comparison with Urokinase.
 Thromb. Res. 1972, 1: 201-208
- Barnes R.W. et al.
 Recurrent versus residual carotid stenosis. Incidence detected by doppler ultrasound.
 Ann. Surg. 1985, 203 (6): 652-659
- Baumgartner H.R.
 The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi.
 Microvasc. Res. 1973, 5: 167-179
- Begent N., Born G.V.R.
 Growth rate in vivo of platelet thrombi produced by iontophoresis of ADP, as a function of mean blood flow velocity.
 Nature 1970, 227: 926-930
- Bell D.N., Goldsmith H.L.
 Platelet aggregation in Poiseuille flow.
 II: Effect of shear rate.
 Microvasc. Res. 1984, 27: 316-330
- Bertè V., Salzman E.W.
 Antithrombotic therapy in coronary artery disease.
 Arteriosclerosis 1985, 5: 119-134

- Boer J. de
Stroming in slagaderen.
Bohn Scheltema en Holkema, Utrecht 1978
- Bollinger A, Brunner U.
Antiplatelet drugs improve the patency rates after femoropopliteal endarterectomy.
VASA 1985 14 (3): 272-279
- Born G.V.R., Cross M.J.
The aggregation of blood platelets.
J. Physiol. 1963, 168: 178-195
- Born G.V.R., Cross N.J.
Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood.
Nature 1963, 197: 974
- Born G.V.R. et al.
The biological background to some therapeutic uses of aspirin.
Am. J. Med. 1983, 14: 2-9
- Bousser M.G. et al.
"AICLIA" controlled trial of aspirin and dipyridamole in the secondary prevention of athero-thrombotic cerebral ischemia.
Stroke 1983, 14 (1): 5-14
- Breddin K. et al.
German-Austrian multicenter two-years prospective study on the prevention of secondary myocardial infarction by ASA in comparison to phenprocoumon and placebo.
Thromb. Haemost. 1977, 38: 168
- Breddin K. et al.
Secondary prevention of myocardial infarction: a comparison of acetylsalicylic acid, placebo and phenprocoumon.
Haemost. 1980, 9: 325-344
- Burch J.W. et al.
Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin.
J. Clin. Invest. 1978, 61 (2): 314-319
- Bush H.L. et al.
Favorable balance of prostacyclin and thromboxane A₂ improves early patency of human in situ vein grafts.
J. Vasc. Surg. 1984, 1: 149-159
- Bush L.R., Patrick D.
The role of the endothelium in arterial thrombosis and the influence of antithrombotic therapy.
Drug Development Research 1986, 7: 319-340

- Callow A.D.
Current status of vascular grafts.
Surg. Clin. N.Am. 1982, 62 (3): 501-513
- Cairns J. et al.
A study of aspirin and/or sulphinyprazole in unstable angina.
Circulation 1984, 70: 415
- Cambria R.P., Abbot W.M.
The autogenous vein as an arterial graft.
In: Vascular Surgery.
Rutherford R.P., ed.; Raven Press, New York 1984
- Cambria R.P. et al.
Endothelial preservation in reversed and in situ autogenous vein grafts. A quantitative experimental study.
Ann. Surg. 1985, 202 (1): 50-55
- Canadian Cooperative Study Group
A randomised trial of aspirin and sulphinyprazole in threatened stroke.
N.Eng. J. Med. 1978, 299 (2): 53-59
- Cattaneo M. et al.
Effect of ticlopidine on platelet aggregation, adhaerence to damaged vessels, thrombus formation and platelet survival.
Thromb. Res. 1985, 37: 29-43
- Cazenave J.P. et al.
Platelet interaction with the endothelium and the subendothelium. The role of thrombin and prostacyclin.
Haemost. 1979, 8: 183-192
- Cerletti Ch. et al.
Aspirin kinetics and inhibition of platelet thromboxane generation. Relevance for a solution of the "aspirin dilemma".
Thromb. Haemost. 1985, 53 (3): 415-418
- Cerletti Ch. et al.
Biochemical selectivity of oral versus intravenous aspirin in rats.
J. Clin. Invest. 1986, 78: 323-326
- Cerskus A.L. et al.
Possible significance of small numbers of functional platelets in a population of aspirin-treated platelets in vitro and in vivo.
Thromb. Res. 1980, 18: 389-397
- Chalmers Th.C. et al.
Evidence favoring the use of anticoagulants in the hospital phase of acute myocardial infarction.
N.Engl. J. Med. 1977, 297 (2): 1091-1096

- Chandler A.B. et al.
Coronary thrombosis in myocardial infarction.
Report of a workshop on the role of coronary thrombosis in the pathogenesis of acute myocardial infarction.
Am. J. Cardiol. 1974, 34: 823-832
- Chesebro J.H., Fuster V.
Drug trials in prevention of occlusion of aorta-coronary artery vein grafts.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1982, 83: 90-93
- Chesebro J.H. et al.
A platelet-inhibitor drug trial in coronary artery bypass operations. Benefit of perioperative dipyridamole and aspirin therapy on early postoperative vein graft patency.
N.Eng. J. Med. 1982, 307 (2): 73-78
- Chesebro J.H., Fuster V.
Platelets and platelet-inhibitor drugs in aortocoronary vein bypass operations.
Internat. J. Cardiology 1983, 2: 511-516
- Chesebro J.H., Fuster V.
Platelet-inhibitor drugs before and after CABG surgery and coronary angioplasty.
The basis of their use, data from animal studies, clinical trial data and current recommendations.
Cardiology 1986, 73: 292-305
- Chesebro J.H., Fuster V.
Antithrombotic therapy for acute myocardial infarction: mechanisms and prevention of deep venous, left ventricular and coronary artery thromboembolism.
Circulation 1986, 74, suppl. III: 1-10
- Clyne C.A.C. et al.
Random control trial of a short course of aspirin and dipyridamole (Persantin) for femorodistal grafts.
Br. J. Surg. 1987, 74: 246-248
- Conrad J. et al.
Effects of longterm administration of ticlopidine on platelet function and hemostatic variables.
Thromb. Res. 1980, 20: 143-148
- Coronary Drug Project Research Group, The
Aspirin in coronary heart disease.
J. Chron. Dis. 1976, 29: 625-642
- Darling R.C., Linton R.R.
Durability of femoropopliteal reconstructions, endarterectomy versus vein bypass grafts.
Am. J. Surg. 1972, 123: 472

- Davi G. et al.
The effect of two low doses of aspirin on whole blood thromboxane and prostacyclin generation in healthy subjects.
Thromb. Haemost. 1983, 50 (3): 669-670
- Dejana E. et al.
Salicylate-aspirin interaction in the rat.
J. Clin. Invest. 1981, 68: 1108-1112
- Dejana E. et al.
Differential salicylate-aspirin interaction on vascular prostacyclin and platelet thromboxane synthesis in patients undergoing saphenectomy.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1985, 180: 533-537
- DeWood M.A. et al.
Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction.
N.Eng. J. Med. 1980, 303 (16): 897-901
- Didisheim P.
Animal models useful in the study of thrombosis and antithrombotic agents.
In: Progress in haemostasis and thrombosis, 1972, 1: 165-197
- Donaldson D.R. et al.
The influence of platelet inhibition on the patency of femoropopliteal dacron bypass grafts.
Vasc. Surg. 1985, 19 (4) :224-230
- Dormandy J.A., Mahir M.A.
The natural history of peripheral atheromatous disease of the legs.
In: Vascular Surgery: Issues in current practice.
R.M. Greenhalgh, ed. Grune & Stratton, London
- Duguid J.B.
Pathogenesis of arteriosclerosis.
Lancet 1949: 925-927
- Dunn F. et al.
Effect de l'administration de ticlopidine sur la fixation de fibrinogène au niveau des plaquettes.
Nouvelle Revue Franc. Hematol. 1983, 25: 132-133
- Dunning A.J.
Dalende sterfte aan ischaemische hartziekten in Nederland: minder patiënten of meer doktoren.
NTvG 1985, 129 (28): 1815-1817
- Dyerberg J. et al.
Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis.
Lancet 1978, 2: 117-119

- Dyken M.L. et al.
Differences in the occurrence of carotid transient ischaemic attacks associated with antiplatelet aggregation therapy.
Stroke 1973, 4: 734
- Eastham R.D.
The low dose aspirin controversy solved at last.
Br. Med. J., Sept. 1985, 291: 738
- Editorial Lancet
Thrombolytic therapy for acute myocardial infarction.
Lancet, July 1987: 138-140
Lancet, March 1988: 565-567
- Edwards W.H. et al.
The role of antiplatelet drugs in carotid reconstructive surgery.
Ann. Surg. 1985, 201 (6): 765-769
- Ehresmann U. et al.
Prophylaxe von Rezidivverschlüssen nach Revaskularisationseingriffen mit Acetylsalicylsäure.
Med. Welt 1977, 28 (26): 1157-1162
- Elwood P.C. et al.
A randomized controlled trial of acetylsalicylic acid in the secondary prevention of mortality from myocardial infarction.
Br. Med. J. 1974, 1: 436-440
- Elwood P.C., Sweetnam P.M.
Aspirin and secondary mortality after myocardial infarction.
Lancet 1979, 22/29: 1313-1315
- Emeis J.J.
Persoonlijke mededeling.
1988
- EPSIM Research Group
A controlled comparison of aspirin and oral anticoagulants in prevention of death after myocardial infarction.
N.Eng. J. Med. 1982, 307 (12): 701-708
- Escolar G. et al.
Ticlopidine inhibits platelet thrombus formation studied in a flowing system.
Thromb. Res. 1987, 45: 561-571
- Falk E.
Plaque rupture with severe preexisting stenosis precipitating coronary thrombosis.
Br. Heart J. 1983, 50: 127-134

- Falk E.
Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death.
Circ. 1985, 71 (4): 699-708
- Fields W.S. et al.
Controlled trial of aspirin in cerebral ischaemia.
Stroke 1977, 8 (3): 301-314
- Fields W.S. et al.
Controlled trial of aspirin in cerebral ischaemia.
Part II: Surgical group.
Stroke 1977, 9 (4): 309-318
- Fitzgerald G.A. et al.
Endogenous prostacyclin biosynthesis and platelet function during selective inhibition of thromboxane synthase in man.
J. Clin. Invest. 1983, 71: 1336-1343
- Fitzgerald G.A. et al.
Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man.
J. Clin. Invest. 1983, 3: 676-688
- Folts J.D. et al.
Blood flow reductions in stenosed canine coronary arteries: vaso-spasm or platelet aggregation.
Circ. 1982, 65 (2): 248-255
- Fraiture de W.H. et al.
Bijwerkingen van ticlopidine; klinische waarneming en immunologisch onderzoek.
NTvG 1982, 126 (3): 1051-1054
- Fry D.L.
Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients.
Circ. Res. 1968, 22: 165-197
- Fuster V., Chesebro J.H.
Antithrombotic therapy. Role of platelet-inhibitor drugs.
Part I : Mayo Clin. Proc. 1981, 56: 102-112
Part II : Mayo Clin. Proc. 1981, 56: 185-195
Part III : Mayo Clin. Proc. 1981, 56: 265-273
- Gaetano de G.
Platelets, prostaglandins and thrombotic disorders.
Clin. Haematol. 1981, 10 (2): 297-325
- Gaetano de G. , Bertè V.
Antiplatelet drugs and thrombosis prevention: ticlopidine in perspective.
Agents Actions 1984, 14: 109-112

- Gaetano de G. et al.
Pharmacology of platelet inhibition in humans: implications of the salicylate-aspirin interaction.
Circ. 1985, 72 (6): 1185-1193
- Gaetano de G. et al.
Current issues in thrombosis prevention with antiplatelet drugs.
Drugs 1986, 31: 517-549
- Gallus A.S.
The use of anti thrombotic drugs in artery disease.
Clin. Haematol. 1986, 15 (2): 505-559
- Gammelgaard A. et al.
Anticoagulant prophylaxis in vascular surgery.
Acta Chir. Scand. 1961, 121: 103-110
- Genesmiddelenbulletin
Thrombolytica : 1984, 12
Bloedplaatjesaggregatieremmers in de cardiologie : 1985, 12
Therapie en profylaxe met anticoagulantia : 1986, 2
- Genton E. et al.
Platelet inhibiting drugs in the prevention of clinical thrombotic disease.
N.Eng. J. Med. 1975, 4: 1174-1178
- Gertz S.D. et al.
Endothelial cell damage and thrombus formation after partial arterial constriction: Relevance to the role of coronary artery spasm in the pathogenesis of myocardial infarction.
Circ. 1981, 63 (3): 476-485
- GISSI (Gruppo Italiano per lo studio della streptochinasi nell'infarcto miocardio)
Long term effects of intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: final report of the GISSI study.
Lancet 1987: 871-874
- Gloviczki P., Hollier L.H.
Can graft occlusion be prevented by drugs?
In: Vascular Surgery. Issues in current practice.
R.M. Greenhalgh et al., ed. Grune & Stratton London, 1986
- Godal H.C. et al.
Aspirin and bleeding time.
Lancet, June 1979: 1236
- Goldman M. et al.
Femoro-popliteal bypass grafts: an isotope technique allowing in vivo comparison of thrombogenicity.
Br. J. Surg. 1982, 69: 380-382

- Goldman M. et al.
Aspirin and dipyridamole reduce platelet deposition on prosthetic femoro-popliteal grafts in man.
Ann. Surg. 1983, 198 (6): 713-716
- Goldsmith H.L.
Blood flow and thrombosis.
Thromb. Diath. Haem. 1974, 32: 35-48
- Goldsmith H.L. et al.
Fluid mechanical stress and the platelet.
Thromb. Diath. Haem. 1975, 34: 32-41
- Goldsmith H.L., Turitto V.T.
Rheological aspects of thrombosis and haemostasis. Basic principles and applications. ICTH-report.
Thromb. Haemost. 1986, 55 (3): 415-435
- Graor R.A., Risius B.
Thrombolysis with recombinant human tissue plasminogen activator in patients with peripheral artery and bypass graft thrombosis.
In: "Tissue plasminogen activator in thrombolytic therapy."
B.E. Sobel, ed.; M. Dekker Inc., New York, 1987, Ch. 10: 171-204
- Green R.M. et al.
Effects of aspirin and dipyridamole on expanded polytetrafluoroethylene graft patency.
Surg. 1982, 92: 1016-1026
- Gryglewski R.J. et al.
Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides.
Prostaglandins 1976, 12: 685
- Gyn van J. et al.
Transient ischaemic attacks en het voorkomen van herseninfarcten.
NTvG 1982, 126 (31): 1405-1413
- Gyn van J. et al.
Transient ischaemic attacks en het voorkomen van herseninfarcten; de behandeling anno 1984.
NTvG 1984, 128 (37): 1777-1778
- Hagen P.O. et al.
Antiplatelet therapy reduces aortic intimal hyperplasia distal to small diameter vascular prostheses (PTFE) in nonhuman primates.
Ann. Surg. 1982, 195: 328-339
- Haimovici H.
Vascular surgery. Principles and techniques.
McCraw Hill, 1984.

- Hamberg M., Samuelson B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71: 3400-3404
- Hamberg M. et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72: 2994-2998
- Hamming J.J.
Over het effect van antistollingstherapie bij vaatplastieken met prothesen van dacron en teflon.
Thesis, Leiden 1962
- Hamming J.J.
Anticoagulantia bij perifere arteriële aandoeningen.
NTvG 1966, 110: 1771-1772
- Hanley S.P. et al.
A regimen for low dose aspirin.
Br. Med. J. 1982, 285: 1299-1302
- Harker L.A. et al.
Endothelium and arteriosclerosis.
Clin. Haematol. 1981, 10 (2): 283-296
- Harker L.A.
Clinical trials evaluating platelet modifying drugs in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and thrombosis.
Circ. 1986, 73 (2): 206-223
- Harrison M.J.G. et al.
Effect of aspirin in amaurosis fugax.
Lancet 1971, 2: 743
- Harter H.R. et al.
Prevention of thrombosis in patients on hemodialysis by low dose aspirin.
N.Eng. J. Med. 1979, 301 (11): 577-579
- Haust M.D.
The morphogenesis and fate of potential and early atherosclerosis in man.
Hum. Path. 1971, 2: 1
- Henry R.L.
Methods for inducing experimental thrombosis.
An annotated bibliography.
Angiology 1962, 13: 554-577
- Hess H. et al.
Drug-induced inhibition of platelet function delays progression of peripheral occlusive arterial disease.
Lancet, Feb. 1985: 415-419

- Hladovec J.
Experimental arterial thrombosis in rats with continuous registration.
Thromb. Diath. Haem. 1973, 29: 407
- Holmsen I., Holsem H.
Partial purification and characterisation of an ADP-phosphohydrolase from human plasma.
Thromb. Diath. Haem. 1971, 26: 177-191
- Holmsen H.
Biochemistry of the platelet release reaction.
In: Biochemistry and pharmacology of platelets.
Ciba Foundation Symposium 35, Amsterdam-Elsevier 1975: 175-205
- Honey G.E., Truelove S.C.
Prognostic factors in myocardial infarction.
Lancet, June 1957: 1155-1161, 1209-1212
- Hoogendoorn D.
Atherosclerotische ziekten van het hart in het ziekenhuis en in de statistiek van doodsoorzaken.
NTvG 1985, 129 (38): 1827-1833
- Hoogendoorn D.
Atherosclerotische hersenaandoeningen in het ziekenhuis en in de landelijke statistiek van doodsoorzaken; het cerebrovasculair accident (CVA).
NTvG 1985, 129 (39): 1883-1887
- Hoogendoorn D.
Atherosclerotische aandoeningen van de perifere vaten in het ziekenhuis en de landelijke statistiek van doodsoorzaken.
NTvG 1985, 129 (49): 1923-1928
- Hoogendijk E.M.G., Cate ten J.W.
Aspirin and platelets.
Lancet, Jan. 1980: 93-94
- Hornstra G., Vendelmans-Starrenburg A.
Induction of experimental arterial occlusive thrombi in rats.
Atherosclerosis 1973, 17: 369
- Hornstra G. et al.
Blood platelets do not provide endoperoxides for vascular prostacyclin production.
Nature 1979, 279 (5708): 66-68
- Hornstra G. et al.
Dietary fats and arterial thrombosis.
Thesis, Maastricht 1980
- Huygens P.C. et al.
Aspirin and platelets.
Lancet, Jan. 1980: 94

- Imparato A.M. et al.
 Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstruction.
 Surgery 1972, 72 (6): 1007-1017
- Inokuchi K. et al.
 Thrombogenic properties at the site of vascular anastomoses studied by a new technique for measuring platelet adherence.
 Surgery 1961, 50: 493-499
- Installé E. et al.
 Prevention by ticlopidine of platelet consumption during extracorporeal circulation for heart surgery and lack of effect on operative and postoperative thrombosis in patients undergoing suprapubic prostatectomy.
 J. Int. Med. Res. 1981, 9: 203-210
- International Anticoagulation Review Group
 Collaborative analysis of longterm anticoagulant administration after acute myocardial infarction.
 Lancet, Jan. 1970: 203-209
- ISIS-2-trial - ISIS Steering Committee
 Intravenous streptokinase given within 0-4 hours of onset of myocardial infarction reduced mortality in ISIS-2.
 Lancet, Febr. 1987: 502
- Jacobs P., Knottenbelt E.
 The antithrombotic drugs in clinical practice.
 S.Afr. Med. Tydskr. 1983, 63: 997-1006
- Jaffe E.A., Weksler B.B.
 Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin.
 J. Clin. Invest. 1979, 63: 532-535
- Jakubowski J.A. et al.
 Cumulative antiplatelet effect of low dose enteric-coated aspirin.
 Br. J. Haemat. 1985, 60: 635-642
- Jakubowski J.A. et al.
 Low dose enteric-coated aspirin: A practical approach to continuous release of low dose aspirin and presystemic acetylation of human platelet cyclooxygenase.
 J. Lab. Clin. Med., 1986, 108 (6): 616-620
- Kallman R. et al.
 Effects of low doses of Aspirin, 10 mg and 30 mg daily, on bleeding time, thromboxane reduction and 6-keto-PGF1 α excretion in healthy subjects.
 Thromb. Res. 1987, 45: 355-361

- Katsumura T. et al.
Therapeutic effect of ticlopidine, a new inhibitor of platelet aggregation on chronic arterial occlusive diseases, a double blind study versus placebo.
Angiology 1982, 33: 357-367
- Kelton J.G. et al.
Thrombogenic effect of high dose aspirin in rabbits.
J. Clin. Invest. 1978, 62: 892-895
- Kern D.
Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A₂ by aspirin. Letter to the editor.
N.Eng. J. Med. 1981, 304 (19): 1173-1174
- Kester R.C.
The thrombogenicity of dacron arterial grafts and its modification by platelet inhibitory drugs.
Ann. Roy. Coll. Surg. Eng. 1984, 66: 241-246
- Kiesewetter W.B., Schumacher H.B.
An experimental study of the comparative efficacy of heparin and dicoumarol in the prevention of arterial and venous thrombosis.
SGO 1948, 86: 687-702
- Kirstein P. et al.
Antiaggregatory, physiological and clinical effects of ticlopidine in subjects with peripheral atherosclerosis.
Atherosclerosis 1980, 36: 471-480
- Klingeman H.G., Egbring R.
Thrombocyten-Release-Proteine im Plasma bei arterieller Verschlusskrankheit unter Ticlopidin-Medikation.
DMW 1982, 107: 1388-1391
- Kretschmer G. et al.
Influence of anticoagulant treatment in preventing graft occlusion following saphenous vein bypass for femoropopliteal occlusive disease.
Br. J. Surg. 1986, 73: 689-692
- Lee H. et al.
The in vitro effect of ticlopidine on fibrinogen and factor VIII binding to human platelets.
Thromb. Haemost. 1981, 46: 590-592
- Lendrum A.C. et al.
Studies on the character and staining of fibrin.
J. Clin. Path. 1962, 15: 401

- Lewis H.D. et al.
Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina.
N.Eng. J. Med. 1983, 309 (7): 396-403
- Liepsch D. et al.
Einfluss der Hämodynamik auf Gefässveränderungen. (Einfluss der Blutströmung in Arterien auf die Bildung von Thrombosen und Stenosen.)
Biomed. Technik 1981, 26 (5): 115-122
- Limet R. et al.
Prevention of aorta-coronary bypass graft occlusion.
Beneficial effect of ticlopidine on early and late patency rates of venous coronary bypass grafts. A double blind study.
J. Thor. Cardiovasc. Surg. 1987, 94: 773-783
- Lindeman J.
Microthrombose en fibrinolyse. Een pathologisch-anatomisch onderzoek.
Thesis Leiden, 1976
- Livio M. et al.
Aspirin, thromboxane and prostacyclin in rats; a dilemma resolved?
Lancet, June 1978: 1307
- Loeliger E.A. et al.
Het nut en de risico's van langdurig voortgezette antistollingsbehandeling bij patiënten die een transmuraal hartinfarct hebben doorgemaakt.
NTvG 1983, 127 (10): 428-433
- Loeliger E.A.
Wass kann von Langzeitantikoagulation bei kardinaler und arterieller Thrombose heute erwartet werden?
Schweiz. Med. Wschr. 1985, 115 (43): 1483-1495
- Lorentz R.L. et al.
Improved aortocoronary bypass patency by low dose aspirin (100 mg daily).
Lancet, June 1984: 1261-1264
- Loscalzo J. et al.
Von Willebrand protein facilitates platelet incorporation in polymerizing fibrin.
J. Clin. Invest. 1986, 78: 1112-1119
- Lubsen J.
Enige kanttekeningen bij de resultaten van de AMIS en PARIS in de Verenigde Staten.
NTvG 1981, 125 (40): 1606-1609

- Marcus A.J.
Aspirin and thromboembolism. A possible dilemma.
N.Eng. J. Med. 1977, 297 (23): 1284-1285
- Marcus A.J.
Aspirin as an antithrombotic medication.
N.Eng. J. Med. 1983, 309 (24): 1515-1517
- Marsh N.A.
Fibrinolysis.
John Wiley Sns Ltd., 1981
- Maseri A. et al.
Coronary vasospasm as a possible cause of myocardial infarction.
N.Eng. J. Med. 1978, 299 (23): 1271-1277
- McCann R.L. et al.
Aspirin and dipyradamole decrease intimal hyperplasia in experimental vein grafts.
Ann. Surg. 1980, 191 (2): 238-243
- McCollum C.N. et al.
Arterial graft maturation: The duration of thrombotic activity in Dacron aortobifemoral grafts measured by platelet and fibrinogen kinetics.
Br. J. Surg. 1981, 68: 61-64
- McCollum C.N., Goldman M.
Platelet-inhibitory therapy in reconstructive arterial surgery.
In: Advances in prostaglandins, thromboxane and leukotriene research. Raven Press, New York, 1985 (vol. 13)
- Meade T.W. et al.
Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study.
Lancet, May 1980: 1050-1053
- Meade T.W.
Overview of drugs in arterial thrombosis.
Phil. Trans. R. Soc. London 1981, B294: 291-303
- Medical Research Council
Br. Med. J. 1959, 1: 803
- Medical Research Council
Br. Med. J. 1964, 2: 837
- Medical Research Council
Br. Med. J. 1969, 1: 335-342
- Miletich J.P. et al.
Properties of the factor XA binding site on human platelets.
J. Biol. Chem. 1978, 253: 6908-6916

- Millikan C.H.
 In: Current concepts in cerebrovascular disease.
 F.H. McDowell, E.H. Sonnenblick, M. Lesch, ed.
 Grune & Stratton, New York 1980 (1)
- Minno, di G. et al.
 Functionally thrombasthenic state in normal platelets following the
 administration of ticlopidine.
 J. Clin. Invest. 1985, 75: 328
- Mitchell J.R.A.
 Anticoagulant therapy in ischaemic heart disease.
 Abstracts of World Medicine 1969, 43 (4): 249-258
- Mitchell J.R.A.
 Secondary prevention of myocardial infarction - the present state of
 the art.
 Br. Med. J. 1980, 280: 1128-1130
- Mitchell J.R.A.
 Anticoagulants in coronary heart disease. Retrospect and prospect.
 Lancet, Jan. 1981: 257-262
- Mitchell J.R.A.
 Prostaglandins in vascular disease: a seminal approach.
 Br. Med. J. 1981, 282: 590-595
- Mitchell J.R.A.
 Theory and practice in prevention of arterial thrombosis.
 Br. Heart J. 1982, 44: 417-420
- Mitchell J.R.A.
 Anticoagulants in myocardial infarction: An appraisal of randomized
 clinical trials.
 In: Anticoagulants and myocardial infarction. A reappraisal.
 T.W. Meade, ed. 1984: 113-135
- Modan B. et al.
 Reduction of hospital mortality from acute myocardial infarction by
 anticoagulant therapy.
 N.Eng. J. Med 1975, 292: 1360-1362
- Moncada S., Vane J.R.
 An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandins endo-
 peroxidase to an unstable substance that inhibits platelet aggre-
 gation.
 Nature 1976, 263: 663-665
- Moncada et al.
 Differential formation of prostacyclin by layers of the arterial wall.
 An explanation for the antithrombotic properties of vascular endo-
 thelium.
 Thromb. Res. 1977, 11: 323-345

- Mundall J. et al.
 Transient monocular blindness and increased platelet aggregability
 with aspirin - a case report.
 Neurol. 1971, 21: 402
- Mustard J.F., Packham M.A.
 Drugs inhibiting platelet function.
 Biochem. Pharmacol. 1973, 22: 3151-3156
- Mustard J.F.
 The relationship between the structure of a thrombus or a haemo-
 static plug and the mechanism involved in its formation.
 In: The structure of a thrombus, 1981
- Mustard J.F.
 Haemostasis and thrombosis.
 In: Mechanisms in thrombosis.
 A.L. Bloom and D.P. Thomas, ed.; Churchill, 1981
- Nemerson Y., Pitlick F.A.
 The tissue factor pathway of blood coagulation.
 In: Progress in hemostasis and thrombosis.
 Th. Spaet, ed.; Grune and Stratton, NY, 1972 (vol. 1)
- Nemerson Y. et al.
 The biology of thrombosis.
 Ann. Rev. Med. 1982, 33: 479-488
- Niewiarowski S. et al.
 Activation of intravascular coagulation by collagen.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966, 123: 196-200
- Nilsson I.M. et al.
 Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and
 defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator on
 increased concentration of plasminogen activator inhibitor.
 Br. Med. J. 1985, 290: 1453-1456
- Oblath R.W. et al.
 Prevention of platelet aggregation and adhaerance to prosthetic
 vascular grafts by aspirin and dipyridamole.
 Surgery, July 1978: 37-44
- O'Brien J.R. et al.
 Ticlopidine - an antiplatelet drug: effects in human volunteers.
 Thromb. Res. 1978, 13: 245-254
- Olsson J.E. et al.
 Anticoagulant vs. antiplatelet therapy as prophylactic against cere-
 bral infarction in transient ischaemic attacks.
 Stroke 1980, 11 (1): 4-9

- Oosterom van A.T. et al.
Control of anticoagulation in rats.
Experienta 1974, 30 (8): 953-955
- Ottolander den G.J.H.
Haemostase en thrombose.
Wetenschappelijke Uitgeverij Bunge, 1979
- Packham M.A.
Platelet function inhibitors.
Thromb. Haemost. 1983 50 (2): 610-619
- Panak E. et al.
Ticlopidine: a promise for the prevention and treatment of thrombosis and its complications.
Haemostasis 1983, 13: 1-54
- Pantely G.A. et al.
Failure of antiplatelet and anticoagulant therapy to improve patency of grafts after coronary bypass.
N.Eng. J. Med. 1979: 962-966
- Paris J. et al.
Anti-thrombotic effect of very low doses of acetylsalicylic acid in rats.
Thromb. Res. 1983, 29: 310-321
- Patrignani P. et al.
Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low dose aspirin in healthy subjects.
J. Clin. Invest. 1982, 69: 1366-1372
- Patrono C. et al.
Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects.
Thromb. Res. 1980, 17: 317-327
- Patrono C. et al.
Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibitor.
Circulation 1985, 72 (6): 1177-1184
- Pedersen A.K., Fitzgerald G.A.
Dose-related kinetics of aspirin.
N.Eng. J. Med. 1984, 311 (19): 1206-1210
- Pedersen A.K., Fitzgerald G.A.
The human pharmacology of platelet inhibition: pharmacokinetics relevant to drug action.
Circ. 1985, 72 (6): 1164-1176
- Pepper D.S.
Macromolecules released from platelet storage organelles.
Thromb. Haemost. 1979, 42: 1667-1672

- Persantin-Aspirin Reinfarction Study Research Group: PARIS I
 Persantin and aspirin in coronary heart disease.
 Circulation 1980, 62 (3): 449-461
- Persantin-Aspirin Reinfarction Study Research Group: PARIS II
 Secondary coronary prevention with persantin and aspirin.
 JACC 1986, 7 (2): 251-269
- Petersen D.M. et al.
 Shear induced platelet aggregation requires von Willebrand Factor
 and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa.
 Blood 1987, 69 (2): 625-628
- Peto R. et al.
 Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doc-
 tors.
 Br. Med. J. 1988, 296: 313-316
- Philp R.B. et al.
 Comparison of antithrombotic activity of heparin, ASA, sulphinyra-
 zone and VK744 in a rat model of arterial thrombosis.
 Haemostasis 1978, 7: 282-293
- Philp R.B.
 Methods of testing proposed antithrombotic drugs.
 CRC Press, 1981
- Philp R.B. et al.
 The influence of dose, time of administration, body temperature and
 salicylate kinetics on the antithrombotic action of acetylsalicylic acid
 in male rats.
 Haemostasis 1983, 13: 42-52
- Physicians' Health Study, Preliminary Report of The Steering Committee of
 Findings from the aspirin component of the ongoing Physician Health
 Study.
 N.Eng. J. Med. 1988, 318: 262-264
- Piepgras D.G.
 Factors influencing postoperative vascular patency.
 Clin. Neurosurg. 1976, 23: 310-317
- Piepgras D.G.
 Recurrent carotid stenosis.
 Ann. Surg. 1986, 203 (2): 205-213
- Preston F.E. et al.
 Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A₂ after low dose
 aspirin.
 N.Eng. J. Med., Jan. 1981: 76-79

- Pumphrey C.W. et al.
A new in vivo model of arterial thrombosis: The effect of administration of ticlopidine and verapamil in dogs.
Thromb. Res. 1982, 28: 663-675
- Remuzzi A. et al.
Platelet adhesion to subendothelium. Effect of shear rate, hematocrit and platelet count on dynamic equilibrium between platelets adhering to and detaching from the surface.
Thromb. Haemost. 1985, 54 (4): 857-861
- Reuther R. et al.
Aspirin in patients with cerebral ischaemia and normal angiograms or non surgical lesions. The results of a double blind trial.
In: Acetylsalicylic acid in cerebral ischaemia and coronary heart disease.
Breddin K., Dorndorf W., Loew D., Marx R., ed.; Stuttgart, FK Schattauer Verlag 1978: 97-106
- Reyers I. et al.
Protective effect of warfarin in arterial thrombosis. Evidence from a vascular prosthesis model in rats.
Thromb. Haemost. 1983, 50 (4): 821-823
- Reyers I. et al.
Warfarin anticoagulation prevents experimental arterial thrombosis in rats without inducing haemorrhage.
Thromb. Res. 1983, 29: 465-468
- Reyers I. et al.
Stasis-induced venous thrombosis.
In: Standardisation of animal models of thrombosis.
K. Breddin and R. Zimmerman, ed.; 1983: 99-104
- Ridolfi R.L., Hutchins G.H.
The relationship between coronary artery lesions and myocardial infarctions: Ulcerations of atherosclerotic plaques precipitating coronary thrombosis.
Am. Heart J. 1977, 3 (4): 468-486
- Rosenkranz B., Frölich J.C.
Plasma concentrations and antiplatelet effects after low dose acetylsalicylic acid.
Prostagl. Leukotr. Med. 1985, 19: 289-300
- Ross R., Glomset J.A.
The pathogenesis of atherosclerosis.
N.Eng. J. Med., Aug. 1976: 369-377
- Ross R., Vogel A.
The platelet derived growth factor.
Cell 1978, 14: 203-210

- Roth G.J., Majerus Ph.W.
The mechanism of the effect of aspirin on human platelets.
J. Clin. Invest. 1975, 56: 624-632
- Rowland M. et al.
Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous solution.
J. Pharm. Sci. 1972, 61: 379-385
- Sandok B.A. et al.
Guidelines for the management of transient ischaemic attacks.
Mayo Clin. Proc. 1978, 53: 665-674
- Sauvage L.R. et al.
Current arterial prostheses.
Arch. Surg. 1979, 114: 687-691
- Sauvage L.R. et al.
Grafts for the 80-s.
The Bob Hope International Heart Research Institute,
Seattle, Washington, 1980
- Sawyer W.T.
Warfarin.
Applied Clinical Pharmacokinetics,
Raven Press, New York 1983: 187-221
- Schoop W. et al.
Experimentelle und klinische Studien zu der sekundären Prävention der peripheren Arteriosklerose.
In: Thrombozytenfunktionshemmer.
A. Bollinger und K. Rhyner, ed.; Thieme, Stuttgart 1983: 49
- Seiffge D., Kremer E.
Influence of ADP, blood flow velocity and vessel diameter on the laser-induced thrombus formation.
Thromb. Res. 1986, 42: 331-341
- Sharp W.V. et al.
Prostaglandin biochemistry of seeded endothelial cells on Dacron prostheses.
J. Vasc. Surg. 1986, 3: 256
- Sinziger H. et al.
Extremely low-dose aspirin (one nulligram per day) renders human platelets more sensitive to antiaggregation prostaglandins.
N.Eng. J. Med. 1984, 311: 1052
- Sitsen J.M.A., Nykamp F.P.
Prostacycline; klinische aspecten.
NTvG 1983, 127 (5): 199-206

- Sixma J.J., Nyessen J.G.
 Characteristics of platelet factor 3 release during ADP-induced aggregation. Comparison with 5-hydroxytryptamine release.
 Thromb. Diath. Haem. 1958, 24: 206-213
- Sixty Plus Reinfarction Study Research Group, The
 A double blind trial to asses long-term oral anticoagulant therapy in elderly patients after myocardial infarction.
 Lancet, Nov. 1980: 989-994
- Sixty Plus Reinfarction Study Research Group, Second Report of The
 Risks of long-term oral anticoagulant therapy in elderly patients after myocardial infarction.
 Lancet, Jan. 1982: 64-68
- Sloan M.A.
 Thrombolysis and stroke.
 Arch. Neurol. 1987, 44: 748-768
- Smith J.B. et al.
 Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets.
 J. Lab. Clin. Med., July 1976: 167-172
- Smit P. de
 Het effect van het langdurig gebruik van orale anticoagulantia bij patiënten met perifeer vaatlijden.
 In: Pathogenese, profylaxe en behandeling van thrombose.
 PAO-cursus, Rotterdam 1988
- Sorensen P.S. et al.
 Acetylsalicylic acid in the prevention of stroke in patients with reversible cerebral ischaemic attacks. A Danish cooperative study.
 Stroke 1983, 14: 15-22
- Stiegler H. et al.
 Einfluss von Ticlopidin auf die periphere obliterierende Arterio-pathie.
 DMW 1984, 109 (33): 1240-1243
- Stoney R.J., String T.S.
 Recurrent carotid stenosis.
 Surg. 1976, 80: 705-710
- Sze P.C. et al.
 Antiplatelet agents in the secondary prevention of stroke.
 Stroke 1988, 19 (4): 436-442
- Telias I.D. et al.
 Salicylate antagonizes the anti-inflammatory action of aspirin in the rat.
 Prostagland. Leukotr. Med. 1985, 20: 23-28

- Terpstra J.L., Thomeer H.
Causes of rethrombosis following arterial reconstructions below the renal arteries.
J. Cardiovasc. Surg. 1975, 16: 393-400
- Thebault J.J. et al.
Effects of ticlopidine, a new platelet aggregation inhibitor in man.
Clin. Pharm. Ther. 1975, 8 (4): 485-490
- Thomas M. et al.
Recurrent carotid artery stenosis following endarterectomy.
Ann. Surg. 1984, 200 (1): 77-79
- Thornton M.A. et al.
Coumadin and aspirin in prevention of recurrence after transluminal coronary angioplasty: a randomized study.
Circ. 1984, 69 (4): 721-727
- Ticlopidine. A promise for the prevention and treatment of thrombosis and its complications.
Haemostasis 1983, 13, suppl. 1 (1-54)
- Tillgren C.
Obliterative arterial disease of the lower limb.
IV - Evaluation of long-term anticoagulant therapy.
Acta Med. Scand. 1965, 178 (2): 203-219
- TIMI-1-trial (Thrombolysis In Myocardial Infarction)
Phase 1: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase.
Circulation 1987, 76 (1): 142-154
- Tohgi H.
The effect of ticlopidine on TIA compared with aspirin: a double blind, twelve-month follow-up study.
Agents and Actions, 1984, 15 (suppl.): "Ticlopidine: Quo Vadis?"
Birkhauser Verlag Basel, 1984
- Tonascia J. et al.
Retrospective evidence favouring use of anticoagulants for myocardial infarctions.
N.Eng. J. Med. 1975, 26: 1362-1366
- Turrito V.T., Baumgartner H.R.
Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate.
Microvasc. Research 1979, 17: 38-54
- UK TIA Group
United Kingdom transient ischaemic attack aspirin trial: interim results.
Br. Med. J. 1988, 296: 316-320

- United States Veterans Administration
J. Am. Med. Ass. 1965, 193: 929
- Vane J.R.
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.
Nature 1971, 231 (23): 232-235
- Vane J.R., Moncada S.
The anti-thrombotic effects of prostacyclin.
Acta Med. Scand. (Suppl.) 1980, 642: 11-23
- Verheugt F.W.A.
Acetosal en het hart.
NTvG 1984, 128 (4): 1951-1953
- Verheugt F.W.A.
Bloedplaatjesaggregatieremmers in de cardiologie.
Geneesmiddelenbulletin 1985, 19 (12)
- Vermynen J. et al.
Thromboxane synthetase inhibition as antithrombotic strategy.
Lancet, May 1981: 1073-1075
- Vermynen J. et al.
Role of platelet activator and fibrin formation in thrombogenesis.
J.A.C.C. 1986, 8 (6): 2B-9B
- Verstraete M.
A pharmacological approach to the inhibition of platelet adhaesion and platelet aggregation.
Haemostasis 1982, 12: 317-336
- Verstraete M. et al.
Randomised trial of intravenous recombinant tissue type plasminogen activator versus intravenous streptokinase in acute myocardial infarction.
Lancet, April 1985: 842-847
- Verstraete M. et al.
Double blind randomised trial of intravenous tissue type plasminogen activator versus placebo in acute myocardial infarction.
Lancet, November 1985: 965-969
- Veterans Administration Cooperative Clinical Trial
Anticoagulants in acute myocardial infarction.
JAMA 1973, 225 (7): 724-729
- Villa S., Gaetano de G.
Prostacyclin-like activity in rat vascular tissues. Fast, long lasting inhibitor by treatment with lysine acetylsalicylate.
Prostaglandins 1977, 14 (6): 1117-1124

- Villa S., Gaetano G. de
Bleeding time in laboratory animals. Effects of prostacyclin; pyrimido-pyrimidine compounds and aspirin in rats.
Thromb. Res. 1979, 15: 727-732
- Villa S. et al.
The inhibitory effect of aspirin on platelet and vascular prostaglandins in rats cannot be completely dissociated.
Br. J. Haemat. 1979, 42: 425-431
- Vighdahl R.L. et al.
Evaluation of anti-inflammatory and antithrombotic drugs in pulmonary and arterial thrombosis.
Thromb. Res. 1979, 16: 117-127
- Violi F. et al.
Effects of ticlopidine on platelet function and blood coagulation.
Thromb. Haemost. 1982, 48: 166-168
- Vollmar J.
Reconstructive surgery of the arteries.
Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1980
- Vroonhoven Th.J.M.V. van, Bruins Slot H.
A critical review of the literature on long term treatment of peripheral arteriosclerosis with oral anticoagulants.
Arch. Chir. Neerl. 1976, 28 (4): 243-248
- Waibel P.
Anticoagulation in der Gefässchirurgie.
Vasa 1976, 5: 107-110
- Weksler B.B.
Platelet inhibitory therapy: Uses and misuses.
Drug Therapy, July 1982: 81-91
- Weksler B.B. et al.
Cumulative inhibitory effect of low-dose aspirin on vascular prostacyclin and platelet thromboxane production in patients with atherosclerosis.
Circulation 1985, 71: 331
- Weichert W. et al.
Laser-induced thrombi in rat mesenteric vessels and antithrombotic drugs.
Haemostasis 1983, 13: 61-71
- Weiss H.J. et al.
Role of shear rate and platelets in promoting fibrin formation on rabbit subendothelium.
J. Clin. Invest. 1984, 78: 1072-1082

- Wessler S., Gitel S.N.
Thrombosis: the relationship of hemostatic mechanisms to drug therapy.
J. Neurosurg. 1981, 54: 1-11
- Wessler S., Gitel S.N.
Warfarin. From bedside to bench.
N.Eng. J. Med. 1984, 311 (10): 645-652
- Whisnant J.P.
The Canadian trial of aspirin and sulphinyprazone in threatened stroke.
N.Eng. J. Med. 1978, 299 (17): 953-954
- White J.G., Gerrard J.M.
Platelet morphology and the ultrastructure of regulatory mechanisms involved in platelet activation.
In: Platelets; a multidisciplinary approach.
G. de Gaetano and S. Garattini, ed.
Raven Press, New York, 1978: 17-34
- White A.M., Heptinstall S.
Contribution of platelets to thrombusformation.
Br. Med. Bulletin 1978, 34 (2): 123-128
- Whittemore A.D. et al.
Secondary femoropopliteal reconstruction.
Ann. Surg. 1981, 193 (1): 35-42
- Working Party on Anticoagulant Therapy in Coronary Thrombosis to the Medical Research Council
Assessment of short term anticoagulant administration after cardiac infarction.
Br. Med. J. 1969, 1: 335-342
- Wright H.P. et al.
Influence of anticoagulant administration on the rate of recanalisation of experimentally thrombosed veins.
Br. J. Surg. 1952, 40: 163-166
- Wright H.P., Kubik M.M.
Recanalisation of thrombosed arteries under anticoagulant therapy.
Br. Med. J., May 1953: 1021-1023
- Wu K. et al.
Differential effects of two doses aspirin on platelet-vessel wall interaction in vivo.
J. Clin. Invest 1981, 68: 382-387
- Zoppo del G.J. et al.
Thrombolytic therapy in stroke: possibilities and hazards.
Stroke 1986, 17 (4): 595-607

Zwaal R.F.A. et al.
Blood cell membranes and haemostasis:
Haemostasis 1982, 11: 12-39

LIJST VAN AFKORTINGEN

APSAC	-	anisoylated plasminogen streptokinase activator complex
ADP	-	adenosinedifosfaat
c-AMP	-	cyclisch adenosinemonofosfaat
ASA	-	acetylsalicylaat
ATP	-	adenosinetrifosfaat
CVA	-	cerebrovasculair accident
HMWK	-	high molecular weight kininogen
INR	-	international normalized ratio
PAF	-	platelet activating factor
PA-I	-	plasminogen activator inhibitor
PF4	-	platelet factor 4
PG (E ₁ ,G ₂ ,H ₂ ,I ₂)	-	prostaglandine (E ₁ ,G ₂ ,H ₂ ,I ₂)
PTFE	-	polytetrafluoroethyleen
RIND	-	reversible ischaemic neurological deficit
SK	-	streptokinase
t-PA	-	tissue type-plasminogen activator
TIA	-	transient ischaemic attack
TX (A ₂ ,B ₂)	-	thromboxaan (A ₂ ,B ₂)
UK	-	urokinase
WF	-	weefselfactor

CURRICULUM VITAE

B. Knippenberg werd op 16 januari 1951 geboren te Hoek van Holland. Het diploma HBS-B werd in 1970 behaald aan de Prof. Casimir Scholengemeenschap te Vlaardingen. Aansluitend werd begonnen met de Studie Geneeskunde aan de Medische Faculteit te Rotterdam, die in 1976 werd afgesloten met het artsexamen. De chirurgische opleiding werd op 1 oktober 1977 in het Bethel Ziekenhuis te Delft (opleider: Dr. C.A. Broodman) aangevangen en per 1 oktober 1979 voortgezet in het St. Hippolytus Ziekenhuis te Delft (opleider: Dr. W.M. Oosterwijk). Op 1 oktober 1983 vond inschrijving als chirurg in het Specialisten Register plaats. Sinds 1 oktober 1985 is de auteur werkzaam in Ziekenhuis Leyenburg te Den Haag, aanvankelijk als chef de clinique en per 1 januari 1987 in associatie met J.K. Bakker, Dr. J. Bender, L.A. Dekker, Dr. W.M. Oosterwijk en Dr. J.C. Sier, chirurgen.