

AGGREGATIE EN LEVENSDUUR VAN THROMBOCYTEN IN DE ZWANGERSCHAP

PLATELET AGGREGATION AND LIFE SPAN IN PREGNANCY

WITH A SUMMARY IN ENGLISH

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. B. LEIJNSE

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP

WOENSDAG 2 MAART 1977 DES NAMIDDAGS

TE 3.00 UUR PRECIES

DOOR

PIET HEIN VAN KESSEL

GEBOREN TE DJAKARTA

1977

BRONDER-OFFSET B.V. - ROTTERDAM

PROMOTOR : DR. H.C.S. WALLENBURG
CO-REFERENTEN : PROF. DR. J. ABELS
PROF. DR. A.C. DROGENDIJK JR.

"The principle preached by Bernoulli
Can lead to results most pecoulli,
It may favour stenosis
And lead to thrombosis
If the blood flow is increased undoulli"

(Edward Lear, 1812 - 1888).

Aan mijn moeder
Aan Ton
Marjolien, Anne
Hein en Caroline.

VERANTWOORDING.

Dit proefschrift werd bewerkt op de afdeling Obstetrie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam, onder de voortvarende en enthousiaste leiding van Dr.H.C.S. Wallenburg. Zijn continue werktempo en optimisme werkten inspirerend.

Prof.Dr.A.C.Drogandijk jr. en Prof.Dr.J.Abels dank ik voor hun kritische beoordeling van het manuscript.

De samenwerking met Nel Rotmans was bijzonder; zij bediende de Filtragometer en overleefde de levensduur van de bloedplaatjes. Els Cassa verzorgde accuraat het aggregatie-onderzoek in het laboratorium voor Hemostase van de afdeling Hematologie onder leiding van Dr.J.Stibbe.

Vanaf het begin van het onderzoek werd veel steun ondervonden van de groep Voeding, sektie Pathofysiologie van de Unilever Research Vlaardingen. Vooral Edward Haddeman heeft mij wegwijs gemaakt in het specifieke van het plaatjes-onderzoek. Collega ten Hoor voorzag het manuscript van waardevolle kanttekeningen. De heren R.N. Lussenburg en J. Zaalberg van de sektie statistiek bewerkten de resultaten. De tekeningen en foto's werden gemaakt door het Audiovisueel Centrum van de E.U.R. en van de Unilever Research.

De experimenten met rhesusapen van het Primaten Centrum TNO-Rijswijk werden geassisteerd door Joke Lems en Heelco Wiersema, terwijl collega Anneke Brand verantwoordelijk was voor de ⁵¹Cr-techniek.

Hanneke Brons-Guidotti wist op de haar eigen en voortreffelijke wijze het manuscript snel te typen.

Dit proefschrift zou niet tot stand zijn gekomen zonder de medewerking van alle zwangere en niet-zwangere vrijwilligers, ook die van de afdeling Obstetrie van het Clara-ziekenhuis. De verpleegkundigen en collegae ben ik erkentelijk voor de steun die zij mij verleenden.

INHOUDSOPGAVE

Hoofdstuk 1

INLEIDING EN VRAAGSTELLING. 11

Hoofdstuk 2

THROMBOCYTEN EN UTEROPLACENTAIRE CIRCULATIE.
LITERATUUROVERZICHT EN ONTWIKKELING VAN EEN WERK-
HYPOTHESE. 16

2.1. De mogelijke invloed van fysiologische
veranderingen in de uteroplacentaire arteriën
op thrombocyten. 16

2.2. De mogelijke invloed van pathologische
veranderingen in de uteroplacentaire arteriën
op thrombocyten. 22

2.3. Conclusie. 25

Hoofdstuk 3

BESPREKING VAN ENKELE METHODEN VAN KWALITATIEF
ONDERZOEK VAN THROMBOCYTEN. 27

3.1. Bepaling van de bloedingstijd. 27

3.2. Bepaling van de adhesiviteit van thrombocyten. 28

3.3. Bepaling van de thrombocyten aggregatie. 29

3.3.1. Bepaling van de thrombocyten aggregatie in
vitro met behulp van de aggregometer. 29

3.3.2. Bepaling van de thrombocyten aggregatie "in
vivo" met behulp van de Filtragometer. 35

3.4. Bepaling van de levensduur van thrombocyten. 44

3.4.1. Bepaling van de levensduur van thrombocyten
met behulp van met ⁵¹Cr gemerkte bloedplaatjes. 45

3.4.2. Bepaling van de levensduur van thrombocyten
met behulp van het acetosal-effect. 47

3.4.3. Vergelijking van de twee methoden ter bepaling
van de levensduur van thrombocyten. 57

3.5. Conclusie. 59

Hoofdstuk 4

CRITERIA VOOR DE SELECTIE VAN PATIENTEN EN PROEF- PERSONEN.	61
4.1. Onderzoek bij zwangeren.	61
4.2. Onderzoek bij niet-zwangeren.	63

Hoofdstuk 5

METHODIEK VAN HET EIGEN ONDERZOEK.	66
5.1. Uitvoering van de thrombocytentelling.	66
5.2. Uitvoering van de bepaling van thrombocyten aggregatie (ADP) in vitro met behulp van de aggregometer.	66
5.3. Uitvoering van de bepaling van thrombocyten aggregatie "in vivo" met behulp van de Filtragometer.	67
5.4. Uitvoering van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal- methode.	68
5.5. Uitvoering van het placenta-onderzoek.	79
5.6. Overige hematologische en chemische bepalingen.	79

Hoofdstuk 6

RESULTATEN VAN HET EIGEN ONDERZOEK.	80
6.1. Resultaten van de telling van het aantal thrombocyten.	81
6.2. Resultaten van de bepaling van thrombocyten aggregatie (ADP) met behulp van de aggrego- meter.	83
6.3. Resultaten van de bepaling van thrombocyten aggregatie met behulp van de Filtragometer.	89
6.4. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal- methode.	93
6.5. Resultaten van het placenta onderzoek.	102
6.6. Resultaten van de overige hematologische en chemische bepalingen.	104

Hoofdstuk 7

SLOTBESCHOUWING EN CONCLUSIES.	106
--------------------------------	-----

Hoofdstuk 8

APPENDIX. SCHATTING VAN DE FOETALE STRALINGSDOSIS NA TOEDIENING VAN ^{51}Cr -THROMBOCYTEN AAN DE ZWANGERE: EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ RHESUSAPEN (Macaca Mulatta).	113
8.1. Uitvoering van het onderzoek.	114
8.2. Resultaten.	117
8.3. Bespreking en conclusie.	119
 SAMENVATTING.	 123
 SUMMARY.	 128
 LITERATUURLIJST.	 133

HOOFDSTUK 1.

INLEIDING EN VRAAGSTELLING.

Over kwantitatieve en kwalitatieve veranderingen van de thrombocyten tijdens de zwangerschap is slechts weinig bekend, dit in tegenstelling tot veranderingen in de bloedstolling, waarover veel onderzoek is verricht, zowel in de normale (McKay, 1973; O'Reilly, 1973 en van Royen, 1974) als in de gestoorde zwangerschap (Lim, 1972; McKay, 1972; Bonnar, 1973; Kool, 1974; Pritchard, 1976).

De resultaten van het onderzoek van thrombocyten in de zwangerschap zijn tegenstrijdig. Sommige auteurs vermelden een dalend aantal plaatjes (Sejeny, 1975) of toegenomen aggregatie (Kunz, 1975) in de normale zwangerschap.

Anderen daarentegen vermelden een onveranderd aantal bloedplaatjes (Todd et al., 1965) en kunnen geen verandering in de aggregatie aantonen (van Royen, 1974). Ook voor wat betreft de hypertensieve zwangerschap en de zwangerschap gecompliceerd door foetale groeivertraging zijn tegenstrijdige gegevens in de literatuur te vinden (McKay et al., 1964; Reid et al., 1971; Frigoletto et al., 1971; Shaper et al., 1968; Trudinger, 1976).

Over de kinetiek van thrombocyten, zoals die zich onder meer uit in de levensduur, zijn in het geheel geen gegevens in de literatuur te vinden.

Uit wat bekend is over de normale structuur en dynamiek van de utero-placentaire circulatie en uit pathologisch-anatomisch onderzoek van de vaten van het placentabéd en van de placenta kan waarschijnlijk worden gemaakt dat de thrombocyten in de utero-placentaire circulatie veranderingen zouden kunnen ondergaan, die kunnen leiden tot aggregatie en thrombusvorming in de uteroplacentaire arteriën. Deze veranderingen zouden in elke zwangerschap kunnen optreden, doch in zeer uitgesproken vorm bij het

bestaan van hypertensie. Deze hypothese wordt aan de hand van literatuurgegevens nader uitgewerkt in hoofdstuk 2. Thrombusvorming in uteroplacentaire arteriën zal leiden tot vermindering van de utero-placentaire circulatie en tot foetale morbiditeit, die onder andere tot uiting komt in een onvoldoende groei van de foetus. Zowel de hypertensie in de zwangerschap als onvoldoende foetale groei vormen een belangrijk probleem in de verloskundige, in ieder geval in Nederland. Een -zij het onvolledige- indruk van de omvang van dit probleem kan worden verkregen uit de gegevens van de Gemeenschappelijke Verloskundige Registratie (van Hemel, 1977). Met toestemming van de deelnemende klinieken zijn in tabel 1.1. de gegevens van het primair klinische materiaal over 1975 samengevat.

Tabel 1.1. Gegevens van de Gemeenschappelijke Verloskundige Registratie over 1975 betreffende de perinatale sterfte, een laag geboortegewicht en het vóórkomen van hypertensie in de zwangerschap.

	standaard perinatale sterfte (> 28 wk amenorrhoe en > 1000 gr)	percentiel geboortegewicht				hyper- tensie*
		< 2.3	2.3-5	5-10	totaal < 10	
primigravidae n = 1894	22 (1.16)	50 (2.63)	51 (2.69)	125 (6.59)	226 (11.9)	167 (8.82)
multigravidae n = 1859	10 (0.53)	53 (2.85)	59 (3.17)	111 (5.97)	223 (12.0)	127 (6.83)
Totaal: 3753	32 (0.85)	103 (2.74)	110 (2.93)	236 (6.28)	449 (11.96)	294 (7.83)

* hypertensie = diastolische bloeddruk \geq 95 mmHg
tussen haakjes zijn de percentages vermeld.

Er werd uitgegaan van een bestand van 3753 enkelvoudige zwangerschappen met een graviditeitsduur van meer dan 36 weken en een onderverdeling in primi- en multigravidae. Het geboortegewicht is geclassificeerd volgens de percentielen van Kloosterman (1970).

De verdeling van primi- en multigravidae is in dit materiaal gelijk. Uit de tabel blijkt, dat in beide groepen de frekwentie van kinderen met een laag geboortegewicht (2.3e - 5e - 10e percentiel) vrijwel identiek en 12% is. Bij de beoordeling van deze gegevens moet er rekening mee worden gehouden, dat dit klinische materiaal geen representatieve steekproef zal vormen uit de populatie zwangeren in Nederland. Daarnaast blijkt dat van de 449 te kleine kinderen slechts 129 (28%) moeders tijdens de graviditeit werden opgenomen voor observatie van negatieve discongruentie. Het merendeel van de gevallen van onderontwikkeling bleef vermoedelijk onopgemerkt tot het moment van de partus en vormde waarschijnlijk niet de reden waarom de bevalling klinisch plaatsvond. In totaal 126 (28%) van de 449 kinderen werd gedurende kortere of langere tijd voor behandeling opgenomen op de couveuze afdeling. Deze 126 kinderen vormen bijna de helft van de totale couveuze populatie van het hier vermelde bestand (126 kinderen met een te laag geboortegewicht versus 142 andere indicaties). Ook in de literatuur zijn er aanwijzingen dat placenta insufficiëntie leidt tot verhoogde perinatale morbiditeit (Bolte et al., 1976). Door de Jong (1975) werd een duidelijke samenhang aangetoond tussen het voorkomen van een niet-optimale neurologische toestand van de pasgeborene en klinische verschijnselen van een onvoldoende uteroplacentaire circulatie bij de moeder. Ook de latere lichamelijke en geestelijke ontwikkeling van kinderen met een te laag geboortegewicht blijkt veelal niet optimaal te zijn. In een follow-up onderzoek in Engeland werden meer dan 14.000 kinderen, allen geboren in één week in 1958, op de leeftijd van elf jaar onder-

zocht. Het blijkt dat van de kinderen met een geboortegewicht beneden de 10e percentiel een significant groter aantal dan van de kinderen met een geboortegewicht boven de 10e percentiel in motorische, psychische en intellectuele ontwikkeling was achtergebleven (Davie et al., 1972).

Bij dit alles dient men zich te realiseren dat het te lage geboortegewicht onderdeel is van een syndroom, waarvoor een groot aantal causale factoren kan worden aangewezen. Naar schatting kan ongeveer 35 % van de gevallen met grote waarschijnlijkheid worden toegeschreven aan een verminderde uteroplacentaire circulatie (Dawes, 1974). In ruim 30 % van de gevallen wordt geen aanwijsbare oorzaak gevonden; het is niet onwaarschijnlijk dat zich ook hierbij gevallen van een verminderde uteroplacentaire circulatie -zonder daarmee samengaande moederlijke symptomen- bevinden.

Uitgaande van het vermoeden dat plaatjesaggregatie en thrombusvorming in de arteriële uteroplacentaire circulatie een belangrijke oorzaak zouden kunnen zijn van onvoldoende groei van de foetus, wordt door sommige auteurs aangeraden zwangeren met foetale groeivertraging te behandelen met stoffen die de thrombocyten aggregatie remmen, zoals dipyridamol, en met anticoagulantia (Buyse et al., 1974; Howie et al., 1975; Van S. Maeck et al., 1948; Bonnar et al., 1975). Gezien de onvolledige kennis van en inzicht in de veranderingen die tijdens de normale en de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap optreden in het gedrag van de bij arteriële thrombotische processen zo nauw betrokken thrombocyten, lijkt deze handelwijze op dit ogenblik prematuur.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is bedoeld om gegevens te verkrijgen over functie en kinetiek van thrombocyten in de zwangerschap. Hierbij is uitgegaan van de hypothese, dat in de normale en vooral ook in de door

hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap structurele en hemodynamische veranderingen in de uteroplacentaire circulatie plaatsvinden, die kunnen leiden tot thrombusvorming in de uteroplacentaire arteriën, een proces waarbij trombocyten nauw zijn betrokken.

De *algemene vraagstelling* van het onderzoek kan dan ook als volgt worden geformuleerd: kunnen in de normale zwangerschap veranderingen in de functie en de kinetiek van trombocyten worden aangetoond, in overeenstemming met de hypothese dat circulerende trombocyten een toegenomen neiging zullen vertonen tot vorming van aggregaten en thrombi, en zo ja, zijn deze veranderingen in de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap meer uitgesproken dan in de ongecompliceerde graviditeit.

Voor de beantwoording van deze vraagstelling werd de aandacht in het bijzonder gericht op de telling *van het aantal* trombocyten en op de bepaling van de *aggregatie* en de *levensduur* van bloedplaatjes.

HOOFDSTUK 2.

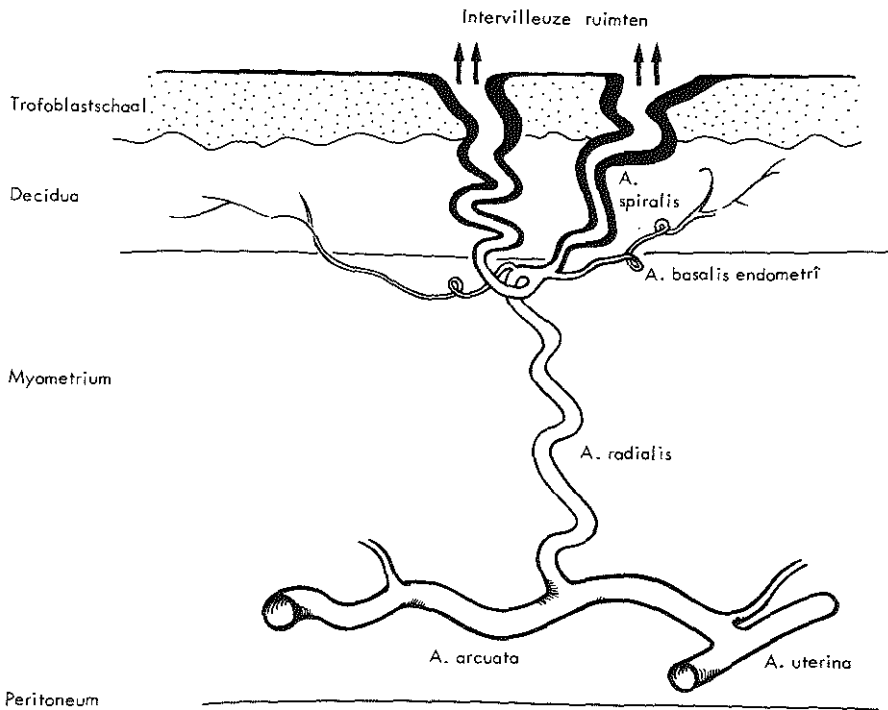
THROMBOCYTEN EN UTEROPLACENTAIRE CIRCULATIE.

LITERATUURVERZICHT EN ONTWIKKELING VAN EEN WERKHYPOTHESE.

In de hierna volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op de structurele en dynamische veranderingen die zich tijdens de normale en de hypertensieve zwangerschap in de uteroplacentaire circulatie voordoen. Op grond hiervan zal een hypothese worden ontwikkeld met betrekking tot de te verwachten invloed van deze veranderingen op thrombocyten.

2.1. De mogelijke invloed van fysiologische veranderingen in de uteroplacentaire arteriën op thrombocyten.

Moederlijk bloed bereikt de intervillieuze ruimten van de hemochoriale placenta van de mens en andere primaten via in de decidua basalis gelegen uteroplacentaire arteriën of spiraalarteriën, zo genoemd wegens hun kurketrekker-vormig verloop. De spiraalarteriën vormen de voortzetting van de in het myometrium verlopende Aa.radiales, de radiaal verlopende takken van de ter weerszijden tegen de buitenzijde van de uterus gelegen Aa.uterinae (figuur 2.1.). Het is reeds lang bekend dat in het verloop van de zwangerschap in de wanden van de uteroplacentaire arteriën ingrijpende structurele veranderingen optreden. Deze, veelal als degeneratief aangeduide, veranderingen werden in verband gebracht met allerlei vormen van zwangerschaps-pathologie en in het bijzonder met hypertensie. Vooral door het onderzoek van Brosens (1964), Brosens et al. (1967) en Robertson et al. (1967) is echter duidelijk geworden dat het hier gaat om fysiologische veranderingen, die in elke graviditeit optreden. Dit inzicht werd voornamelijk verkregen door onderzoek van direct post partum uit het placentabed genomen biopten. In de niet-zwangere uterus zijn de spiraalarteriën dunne



Figuur 2.1. Schematische voorstelling van de moederlijke arteriële bloedvoorziening van de placenta.

~200-300 micron in doorsnede- musculaire arteriën met een goed ontwikkelde elastica interna. Reeds vanaf de eerste weken van de zwangerschap worden in de wand van de spiraalarteriën typische grote cellen gezien (McKay et al., 1958). In de oudere placenta hebben deze, soms meerkernige, cellen vaak een duidelijke perifere basofilie en lijken lichtmicroscopisch op trofoblastcellen (Drogendijk, 1967). De cellen verstoren de regelmatige opbouw van het vaatendotheel en van de vaatwand, terwijl in de muscularis fibrinoid materiaal wordt afgezet. Het distale deel van de arterie wordt daarbij in de richting van de intervillieuze ruimte steeds wijder (Drogendijk, 1967). Electronenmicroscopisch onderzoek (de Wolf et al., 1973) heeft overtuigend aangetoond dat de intramurale cellen inderdaad

trofoblastcellen zijn en dat het fibrinoïde materiaal afkomstig is van moederlijk fibrine en van materiaal uitgescheiden door de trofoblastcellen. Met het vorderen van de zwangerschap bereikt de trofoblastinvasie omstreeks de 14e week het begin van het in het myometrium gelegen deel van de arteriën en wordt ook daar voor een deel het endotheel, de elastica en de muscularis vervangen door fibrinoid. De ongeveer 100 uteroplacentaire arteriën (Boyd en Hamilton, 1967; Brosens et al., 1967) vertonen uiteindelijk het beeld van wijde, starre, trechtervormig eindigende buizen met een onregelmatig endotheel, die hun bloed uitstorten in de intervillieuze ruimten. Deze morfologische veranderingen kunnen hemodynamisch als gunstig worden beschouwd, gezien de ten gevolge van de vaatverwijding afgenomen vasculaire weerstand, waardoor de doorstroming bij gelijkblijvende perfusiedruk zal kunnen toenemen. Vasomotorische activiteit zal zich moeten afspelen in de intacte, niet verwijde Aa. radiales, dus meer perifeer in het myometrium.

Het is te verwachten dat de beschreven morfologische veranderingen van de uteroplacentaire arteriën hemodynamische gevolgen zullen hebben. Onder normale omstandigheden is de bloedstroom in de meeste arteriën *laminair*, met stroomlijnen parallel aan elkaar in de richting van de stroom (Burton, 1972; Lentini et al., 1974). Adhesieve krachten en wrijving tegen de vaatwand hebben de neiging om de perifere stroom van de bloedmassa te belemmeren. Dit heeft tot gevolg dat de laminaire bloedstroom als het ware is opgebouwd uit concentrische cilindrs met een oplopende stroomsnelheid naar de as van het bloedvat. Een belangrijke eigenschap van deze laminaire stroom is dat bloedcellen, waaronder ook de thrombocyten, vooral met de snellere centrale "cilinders" mee stromen, waardoor de buitenste "cilinders" relatief celarm zijn (Lentini et al., 1974). Verstoring van de laminaire ordening leidt tot turbulentie; de *turbulente*

bloedstroom wordt getypeerd door het feit dat bloedcellen in alle richtingen bewegen. Turbulentie treedt op bij een bepaalde verhouding tussen de stroomsnelheid van het bloed (V), de diameter van het bloedvat (r), de viscositeit (η) en de dichtheid van het bloed (ρ). Deze verhouding wordt weergegeven door het dimensieloze getal van Reynolds (R), waarvoor geldt:

$$R \sim \frac{V \rho r}{\eta}$$

De kritische grens voor het optreden van turbulentie in een lang recht vat ligt bij $R \sim 1000$ (als V de gemiddelde snelheid van het bloed is), een grens die normaliter slechts wordt bereikt in de aorta. Het is onvoldoende bekend of deze kritische grens alleen geldt voor lange rechte bloedvaten. Uit de formule blijkt dat een toeneming van de stroomsnelheid ten gevolge van een verkleining van de diameter van een bloedvat, bij gelijkblijvende doorstroming, zal resulteren in een groter worden van R, waardoor turbulentie kan ontstaan. Immers, aangezien $V = \dot{Q}/\pi r^2$, waarin \dot{Q} is de doorstroming per tijdseenheid en r de radius van het vat, kan ook worden geschreven $R \sim \frac{\dot{Q} \cdot \rho}{\pi \eta r}$. Turbulentie ten gevolge van een lokale vernauwing in een arterie treedt al op bij een getal onder de kritische waarde van Reynolds, zoals uit experimenteel werk is gebleken (Burton, 1972), en is sterk afhankelijk van het profiel van de stenose. Roach (1963) bevestigde de klinisch reeds lang bekende waarneming van de "poststenotische dilatatie" experimenteel door bij honden een chronische locale vernauwing van een arterie te veroorzaken. Hij nam waar dat stroomafwaarts van de stenose een vibratie van de arteriewand optrad, die hoorbaar was als een geruis, gevolgd door dilatatie van de arterie. De poststenotische turbulentie van de bloedstroom leidt dus tot trilling van de vaatwand, waarbij door de op de vaatwand uitgeoefende krachten dilatatie ontstaat.

Men zou zich kunnen voorstellen dat zich iets dergelijks afspeelt in de uteroplacentaire arteriën. Door de eerder beschreven trofoblastinvasie met fibrinoidafzetting in de wand zal een plaatselijke vernauwing optreden, distaal waarvan ten gevolge van turbulentie dilatatie zal ontstaan. Deze dilatatie zal zich, met de voortschrijdende trofoblastinvasie, uitbreiden in de richting van de grens decidua - myometrium en iets voorbij deze grens tot stilstand komen. Op grond van deze hypothese kan de uiteindelijke merkwaardige trechtervormige dilatatie van het uiteinde van de uteroplacentaire arteriën worden verklaard. Deze verklaring vindt steun in de waarneming dat bij de rhesusaap, waar de trofoblastinvasie van de uteroplacentaire arteriën veel minder uitgesproken is dan bij de mens, ook de terminale dilatatie veel minder is (Ramsey en Harris, 1966).

Afgezien van de vraag hoe de terminale dilatatie van de uteroplacentaire arteriën tot stand komt, is de situatie zoals die uiteindelijk aanwezig is, uitermate geschikt voor het doen ontstaan van turbulentie: relatief nauwe Aa.radiales die plotseling overgaan in wijdere Aa.spirales, een hoge stroomsnelheid en daardoor, overeenkomstig het principe van Bernoulli ($\Delta P = -\Delta(1/2 \rho v^2)$), een snel drukverval (Moll en Künzel, 1973), met daarbij nog de wervelingen veroorzakende krommingen van de spiraalarteriën. De bij vele zwangeren te horen zogenaamde "placentageruisen" wijzen ook op vibratie en turbulentie in de uteroplacentaire circulatie.

De beschreven structurele en hemodynamische veranderingen die in de uteroplacentaire arteriën plaatsvinden, predisponeren tot het ontstaan van thrombocytenaggregaten en op basis daarvan tot arteriële thrombose. In de eerste plaats immers, zal het bloed tussen de onderbroken endothelbekleding van de spiraalarteriën in aanraking komen met collageen, waardoor thrombocyten aggregatie wordt

geïnduceerd. Dit kan leiden tot arteriële thrombose en placenta infarctering (zie paragraaf 2.2.). In de tweede plaats zal door de turbulentie van de bloedstroom frequenter en heviger contact tussen de bloedcellen onderling en met de vaatwand optreden; hierdoor zullen membraanlesies ontstaan en ADP kan uit de erythrocyten en thrombocyten vrijkomen, waardoor plaatjesaggregatie kan worden geïnduceerd. Ook dit mechanisme kan leiden tot arteriële thrombose (Kontras et al., 1963; Pederson et al., 1967).

De placenta infarctering, die een gevolg is van de thrombotische afsluiting van uteroplacentaire arteriën, leidt tot een verminderde placentafunctie. Dit kan onder meer worden afgelezen aan het feit dat kinderen van zwangeren met een klinisch ongestoord verlopen zwangerschap, doch met een placenta met infarcten, een significant lager geboortegewicht hebben in vergelijking met kinderen waarvan de placenta geen infarcten bevatte (Wallenburg, 1968; Fox, 1967).

Ook bij het binnenstromen van het arteriële bloed in het relatief wijde en onregelmatig begrensde cotyledon zal turbulentie kunnen ontstaan, waardoor thrombocyten aggregatie kan optreden. Dat dit inderdaad het geval is wordt geïllustreerd aan de zogenaamde intervillieuze thrombi, die in ongeveer 1/4 van alle normale voldragen placentas worden aangetroffen, vooral in de centra van de cotyledonen en tegen de choriale plaat (Wallenburg, 1968), plaatsen waar turbulentie kan worden verwacht. Microscopisch onderzoek van deze thrombi laat zien dat de verse thrombi voornamelijk bestaan uit plaatjesaggregaten met daartussen relatief weinig bloedcellen en fibrine (Wallenburg, 1971). Ook toonden Møe en Jorgensen (1968) in een electronenmicroscopisch onderzoek aan dat de frequent voorkomende fibrine neerslagen op het syncytium van de vlokken en de choriaalplaat afkomstig zijn van thrombi uit matернаal bloed. Zij betrokken in dit onderzoek zowel de immature placenta van

8 - 24 weken als de mature placenta en constateerden dat de neerslag begint als thrombocytenneerslag en dat pas secundair fibrine wordt gevormd. Nadrukkelijk wordt door hen gesteld dat de thrombocytenneerslag niet ontstaat door interactie met collageen uit de basale membraan van de vlok omdat deze intact was.

Er zijn dus zeker indirecte aanwijzingen dat de fysiologische, structurele en rheologische voorwaarden in de uteroplacentaire arteriën en de intervillieuze ruimten gunstig zijn voor het doen ontstaan van beschadigingen van thrombocyten, van thrombocyten aggregaten en arteriële thrombi.

2.2. De mogelijke invloed van pathologische veranderingen in de uteroplacentaire arteriën op thrombocyten.

De functionele eenheid van de placenta is het systeem van foetale vlokken uitgaande van één stamvlok, dat wordt aangeduid als cotyledon. Elk cotyledon wordt van moederlijk bloed voorzien door één enkele uteroplacentaire arterie, die uitmondt juist onder het centrum van het cotyledon (Freese, 1968; Freese en Maciolek, 1969). Bij de ongeveer 100 uteroplacentaire arteriën van de menselijke placenta behoren dus ongeveer 100 cotyledonen (Freese et al., 1968). Een onvoldoende metabole functie van de placenta ("placenta-insufficiëntie") houdt in een onvoldoende functie van alle of van een aantal cotyledonaire eenheden. Dit kan worden veroorzaakt door primaire afwijkingen van de trofoblast -een zogenaamde membraaninsufficiëntie- dan wel door een verminderde foetale of maternale placentacirculatie, een zogenaamde circulatoire insufficiëntie (Wallenburg, 1975). Een uiting van een maternale circulatoire insufficiëntie is het reeds eerder genoemde placenta infarkt.

De term placenta infarkt wordt vaak ten onrechte gebruikt voor elke macroscopisch zichtbare min of meer witte af-

wijking in de placenta. In zijn studie over de morfologie en pathogenese van het placenta infarkt komt Wallenburg (1973a) echter tot de conclusie dat het placenta infarkt morfologisch van alle andere afwijkingen in de placenta kan worden onderscheiden en dat het de pathologisch-anatomische kenmerken vertoont van een echt infarkt, dat wil zeggen een ischemische necrose veroorzaakt door onderbreking van de arteriële maternale cotyledonaire circulatie. Bij de zwangere rhesusaap kon experimenteel worden aangetoond dat afsluiting van een uteroplacentaire arterie altijd leidt tot infarcering van het bijbehorende cotyledon (Wallenburg, 1973b).

Bij de mens wordt placenta infarcering veroorzaakt door thrombotische afsluiting van een of meer spiraalarteriën, wat ischemische necrose van de bijbehorende cotyledonen ten gevolge heeft (Wilkin, 1965; Fox, 1976). Blijkbaar bestaat er dus bij de mens, evenals bij de rhesusaap, geen effectieve collaterale maternale circulatie tussen de cotyledonen; elke uteroplacentaire arterie is functioneel te beschouwen als een eindarterie.

De afsluiting van de spiraalarteriën bij placenta infarkten blijkt te worden veroorzaakt door typische arteriële thrombi, gekenmerkt door grote hoeveelheden plaatjesaggregaten. In zijn concept van de pathogenese van placenta infarcering stelt Wallenburg (1971) dat een primaire arteriële thrombose zowel kan ontstaan ten gevolge van de fysiologische veranderingen in het deciduale deel van de spiraalarteriën, zoals reeds werd besproken, alsook op basis van atherosclerose en/of vasospasme van de meer in het myometrium gelegen delen van de uteroplacentaire arteriën. Dit laatste ziet men vrijwel uitsluitend in de hypertensieve zwangerschap. Brosens (1972) en Robertson et al. (1975) hebben karakteristieke veranderingen beschreven van de uteroplacentaire arteriën ter hoogte van de myometrio-deciduale overgang in biopsiën, direct post partum genomen

uit het placentabed van hypertensieve zwangeren. Zij beschrijven twee opvallende kenmerken: ten eerste zijn de normale veranderingen in de wand van de uteroplacentaire arteriën minder uitgesproken en zetten zich niet voort tot in het myometrium gedeelte. De musculo-elastische vaatwand blijft daar bestaan, het lijkt of de trofoblast-invasie en ook de terminale dilatatie achterblijft waardoor een inadequaat placentabed met een hogere weerstand ontstaat. Ten tweede ontstaat, waarschijnlijk als gevolg van de hypertensie, atherose en fibrinoïde necrose in dit gedeelte van de uteroplacentaire arterie. Het is niet waarschijnlijk dat de plaatsen waar de placentabedbiopsiën werden genomen exact overeenkwamen met placenta infarcten. Dit betekent dus dat de gevonden afwijkingen algemeen voorkomen en slechts plaatselijk tot placenta infarctering leiden. Volgens het mechanisme dat is uiteengezet in 2.1. zal, ten gevolge van de plaatselijke vernauwing van de uteroplacentaire arteriën door atherotische en fibrinoïde plaques, turbulentie van de bloedstroom met beschadiging van thrombocyten en vorming van aggregaten en thrombi kunnen worden verwacht. Vaatspasme zou een additionele causale factor kunnen zijn in de pathogenese van placenta infarctering in de hypertensieve zwangerschap. Ook vaatspasme veroorzaakt een plaatselijke vernauwing met turbulentie van de bloedstroom en beschadiging van thrombocyten als mogelijk gevolg. Er blijkt een positieve correlatie te bestaan tussen het vóórkomen en de uitgebreidheid van placenta infarctering en de ernst van de moederlijke hypertensie en/of de mate waarin de foetus in groei achterblijft (Wallenburg, 1969). Gezien het feit dat placenta infarctering wordt veroorzaakt door afsluiting van uteroplacentaire arteriën door plaatjethrombi, kan worden verwacht dat de beschadiging van de thrombocyten bij toenemende ernst van hypertensie en/of niet-optimale foetale groei eveneens kwantitatief en/of kwalitatief ernstiger zal zijn.

2.3. Conclusie.

De structurele en hemodynamische veranderingen die tijdens de zwangerschap in de uteroplacentaire arteriën optreden moeten, op grond van het feit dat zij in elke normale zwangerschap worden aangetroffen, als fysiologisch worden beschouwd. De door de dilatatie van het deciduale deel van de spiraalarteriën veroorzaakte vermindering van de vaatweerstand is hemodynamisch gunstig. De predispositie tot plaatjesaggregatie en arteriële thrombusvorming, die met al deze veranderingen gepaard zou kunnen gaan, lijkt de tol te zijn die moet worden betaald voor de vermindering van de vaatweerstand. Een interessante speculatie is echter dat de uit de beschadigde thrombocyten vrijkomende prostaglandines, vooral die van de E-groep, een vaatverwijdende invloed zouden kunnen uitoefenen op de Aa. radiales. Een dergelijk effect van prostaglandines op de uteroplacentaire circulatie is aangetoond bij de hond (Terragno et al., 1974), het konijn (Venuto et al., 1975) en de rhesusaap (Franklin et al., 1974).

De in dit hoofdstuk besproken literatuurgegevens leiden tot de *hypothese*, dat in iedere zwangerschap ten gevolge van de fysiologische veranderingen in de uteroplacentaire arteriën beschadiging van thrombocyten zal optreden met een toegenomen neiging tot thrombocyten aggregatie. Mogelijk ten gevolge daarvan ontstaan veranderingen in de kinetiek van bloedplaatjes. Deze tendens tot vorming van plaatjesaggregaten kan leiden tot het ontstaan van thrombi in de uteroplacentaire arteriën, vooral als daarvoor voorwaarden zoals atheromateuze veranderingen en/of vasospasme aanwezig zijn. Deze voorwaarden worden vooral gevonden in de hypertensieve zwangerschap.

In het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd nagegaan of voor deze hypothese steun kan worden gevonden in de resultaten van onderzoek van de *aggregatie* van thrombocyten in het perifere bloed, en van de *kinetiek* van thrombocyten, in de *normale* en in de *gestoorde zwangerschap*,

met of zonder placenta infarctering. De thrombi in de uteroplacentaire arteriën veroorzaken een vermindering van de moederlijke placentacirculatie die zich kan uiten in een onvoldoende groei van de foetus en/of infarctering van de placenta.

HOOFDSTUK 3.

BESPREKING VAN ENKELE METHODEN VAN KWALITATIEF ONDERZOEK VAN THROMBOCYTEN.

In de literatuur vindt men uitvoerige overzichten van de vele technieken die thans worden toegepast ter bepaling van een groot aantal aspecten van de thrombocytenfunctie (ten Cate, 1972; ten Cate et al., 1972; Marcus, 1969; Mustard en Packham, 1970; Weiss, 1975; 1976). Hier zullen slechts een aantal methoden worden besproken die voor ons onderzoek van direct belang zijn.

3.1. Bepaling van de bloedingstijd.

Bepaling van de bloedingstijd geeft een goed inzicht in het functioneren van bloedplaatjes in het proces van de hemostase. Deze in-vivo plaatjes functietest wordt meestal uitgevoerd volgens de Ivy methode. Daarbij worden drie 2.5 mm diepe wondjes gemaakt in de buigzijde van de onderarm na het aanleggen van een bloeddrukmanchet, die wordt opgepompt tot 40 mm.Hg. Met tussenpozen van 10 seconden wordt het bloed met vloeipapier gedept en de totale tijd, die verloopt tussen het maken van de wondjes en het stoppen van de bloeding wordt gemeten. De gevoeligheid van de methode is te verhogen door standaardisering van de verwonding; Mielke (1969) ontwierp daarvoor een instrument waarmee twee incisies van 12 mm lengte en 1 mm diepte worden gemaakt.

De normale spreiding van de bloedingstijd wordt opgegeven tussen 1 en 6 minuten met een gemiddelde van 5 minuten (Mielke et al., 1969). Zoals voor elk onderzoek van thrombocytenfuncties geldt, dient te worden nagegaan of in de voorafgaande twee weken aspirine of een ander middel waarin acetylsalicylzuur is verwerkt werd ingenomen, omdat hierdoor een verlenging van de bloedingstijd ontstaat.

Als alleenstaande test heeft de bloedingstijd weinig waarde; in combinatie met andere onderzoeksmethoden lijkt het mogelijk om met behulp van de gevoelige Mielke methode te differentiëren tussen normale en dysfunctionele bloedplaatjes (Harker en Slichter, 1971).

Wegens het feit dat de incisies van de methode Mielke ontsierende littekens kunnen nalaten werd besloten deze methode bij ons onderzoek, dat betrekking heeft op vrijwilligsters, niet toe te passen.

3.2. Bepaling van de adhesiviteit van thrombocyten.

Het oppervlak van een bloedplaatje wordt adhesief na snelle vervorming (shape change). Door deze eigenschap kan de thrombocyt zich vasthechten aan een beschadigde vaatwand en levert zo een bijdrage aan de eerste fase van hemostase. In het laboratorium verstaat men onder thrombocytenadhesiviteit de mate waarin het bloedplaatje zich hecht aan een vreemd oppervlak, bijvoorbeeld glas, mits er voldaan is aan zekere voorwaarden zoals de aanwezigheid van Ca ionen, fibrinogeen en andere plasmafactoren. Het onderzoek kent twee uitvoeringen, één in-vivo en één in-vitro, die op hetzelfde principe berusten, namelijk bepaling van het verlies aan bloedplaatjes, dat wordt veroorzaakt door adhesie aan een wondrand of aan glasparels. Ondanks pogingen om te komen tot standaardisatie van de methoden om het verlies van thrombocyten aan het contactoppervlak te kwantificeren (o.a. Hellem, 1970), wordt onderlinge vergelijking van de resultaten ernstig bemoeilijkt door de vele modificaties die in gebruik zijn.

In de literatuur wordt vermeld dat bij thrombotische ziekteprocessen een verhoogde plaatjesadhesiviteit kan worden gevonden (Fitzgerald et al., 1971; Mustard en Packham, 1970). De gevoeligheid en de reproduceerbaarheid van de beschikbare technieken lijkt echter onvoldoende om

de geringe veranderingen in de plaatjesadhesiviteit die tijdens de zwangerschap zouden kunnen optreden, op betrouwbare wijze aan te tonen (McKay et al., 1964). Wij hebben daarom de bepaling van de plaatjesadhesiviteit niet in ons onderzoek opgenomen.

3.3. Bepaling van de thrombocyten aggregatie.

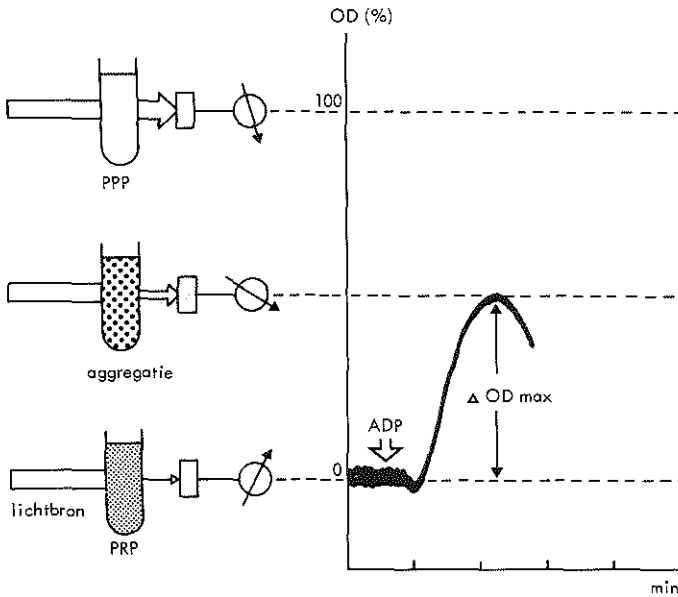
Onder thrombocyten aggregatie verstaat men het verschijnsel dat bloedplaatjes zich onder invloed van een prikkel aan elkaar hechten, waardoor klontering ontstaat. Door de vorming van aggregaten op de rand van een beschadigd bloedvat nemen thrombocyten deel aan de primaire hemostase. Zoals reeds eerder werd vermeld vormen thrombocyten aggregaten het begin van een arteriële thrombus.

Bepaling van thrombocyten aggregatie in vivo is in het dierexperiment uitgevoerd (Hornstra et al., 1972; Broersma et al., 1973), maar klinisch niet toepasbaar. In-vitro methoden voor het aantonen van plaatjesaggregatie hebben hun bruikbaarheid bewezen voor het aantonen van een reeks fysiologische veranderingen in bloedplaatjes, die beginnen na het toedienen van een bepaalde prikkel en uiteindelijk resulteren in aggregaten van functioneel veranderde bloedplaatjes. Vele stoffen met verschillende chemische structuur kunnen het proces van de thrombocyten aggregatie op gang brengen, waaronder ook stoffen die uit het bloedplaatje zelf vrij kunnen komen (release reactie). De belangrijkste hiervan is waarschijnlijk adenosinedifosfaat (ADP). Tot de fysiologische stimuli voor het ontstaan van plaatjesaggregatie behoren behalve ADP ook de catecholaminen, collageen, thrombine en serotonine. Twee methoden voor de bepaling van aggregatie zullen hier nader worden besproken.

3.3.1. Bepaling van de thrombocyten aggregatie in vitro met behulp van de aggregometer.

De meest gebruikte methode voor het meten van aggregatie werd geïntroduceerd door Born (1962) en O'Brien (1962).

Het principe berust op de registratie van veranderingen in de doorlaatbaarheid voor licht van een thrombocytensuspensie, die met behulp van een roerder in constante beweging wordt gehouden en waaraan een aggregatie-inducerende stof is toegevoegd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een fotometer. Een constante beweging van de plaatjessuspensie in de fotometer cuvette wordt verkregen door middel van een magnetisch bewogen metalen (gesiliconeerde) roerder. De output van de fotocel, welke een maat is voor de veranderingen in de optische dichtheid van de plaatjessuspensie, kan op een schrijver worden geregistreerd (figuur 3.1.).

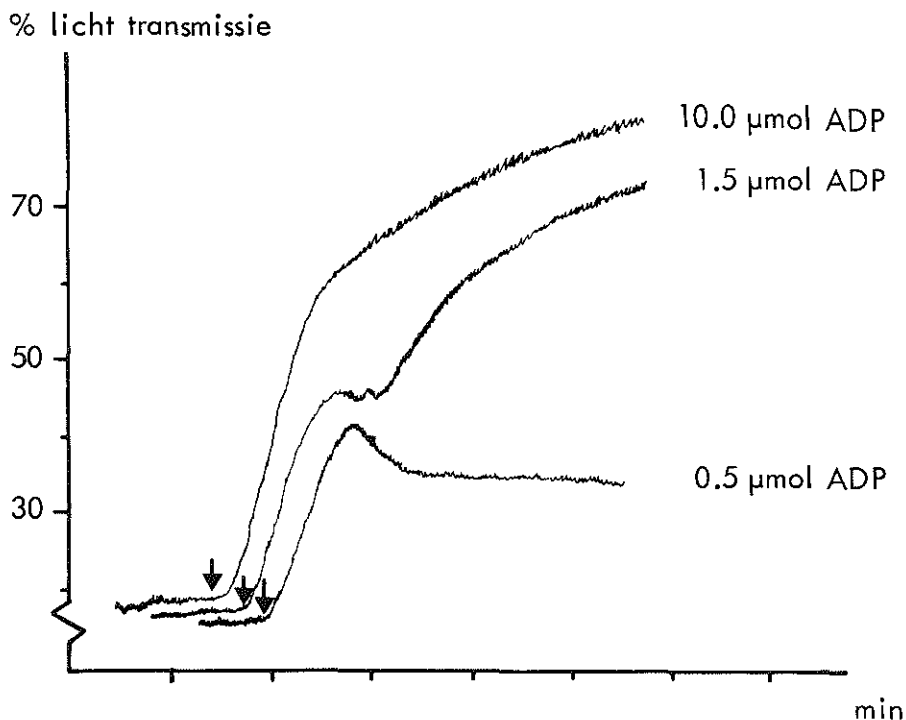


Figuur 3.1. Schema van aggregometer en aggregatiecurve zoals deze ontstaat na inductie van de aggregatie.

De cuvette met de plaatjessuspensie (PRP, fijne stippling) veroorzaakt een maximale verstrooiing van het licht; dit wordt gelijkgesteld aan 0 % optische doorlaatbaarheid (OD). De schaalverdeling loopt tot maximale lichtdoor-

laatbaarheid (100 % OD), welk punt gelijkgesteld wordt aan de lichtdoorlaatbaarheid van een cuvette met plaatjesarm plasma (PPP). Wordt nu aan de in constante beweging gehouden plaatjessuspensie een aggregatie-inducerende stof toegevoegd, dan zullen aggregaten ontstaan (groeve stippeling) met als gevolg daarvan een toeneming van de lichttransmissie. De soort aggregatiecurve, die op deze wijze wordt verkregen, is afhankelijk van de aard van het aggregatie-inducerende reagens en van de concentratie waarin dit wordt toegevoegd. Het gebruik van ADP als aggregatie-inducerende stof voor kwalitatief aggregatie onderzoek is algemeen aanvaard. In het kader van ons onderzoek zal de beschrijving van de aggregatiecurve en de daarbij gehanteerde parameters beperkt blijven tot die van de ADP aggregatiecurve.

ADP aggregatie is dosis afhankelijk; een geringe eindconcentratie van bijvoorbeeld 1 μmol ADP zal resulteren in een reversibele aggregatie, terwijl een hogere eindconcentratie van bijvoorbeeld 10 μmol ADP bij een normaal individu zal leiden tot irreversibele aggregatie. Deze twee fasen van aggregatie kunnen in de curve worden onderscheiden (figuur 3.2.). Direct na toevoegen van ADP (zie ook figuur 3.1.) vertoont de curve een geringe toename in de optische dichtheid als gevolg van een vormverandering van de bloedplaatjes. Dit betekent dat het bloedplaatje, met zijn normale discusvorm, verandert in een spinachtige cel met een onregelmatig oppervlak, waardoor het doorvallende licht sterker zal worden verstrooid. Deze vormverandering wordt gevolgd door een primaire fase van thrombocyten aggregatie, die weer een direct effect is van het ADP op de bloedplaatjes. Doordat de suspensie door middel van de roerder in constante beweging wordt gehouden komen de spinachtig veranderde plaatjes via hun lange pseudopodia met elkaar in contact en vormen reversibele aggregaten. In figuur 3.2. wordt deze situatie geschetst in de curve waarbij een eindconcentratie van 0.5 μmol ADP werd gebruikt.



Figuur 3.2. Aggregatie bij gebruik van verschillende eindconcentraties ADP, toegevoegd bij ↓.

De tweede fase van thrombocyten aggregatie, in figuur 3.2. aanwezig bij een eindconcentratie van 1.5 en 10 μmol ADP, wordt veroorzaakt door vrijkomen van ADP uit de thrombocyten zelf en leidt tot vorming van irreversibele aggregaten. Het bereiken van maximale aggregatie, met maximale lichttransmissie, kan bifasisch verlopen zoals weergegeven bij 1.5 μmol ADP of samenvallen met de eerste fase van aggregatie en spoedig het maximum bereiken, zoals bij 10 μmol ADP.

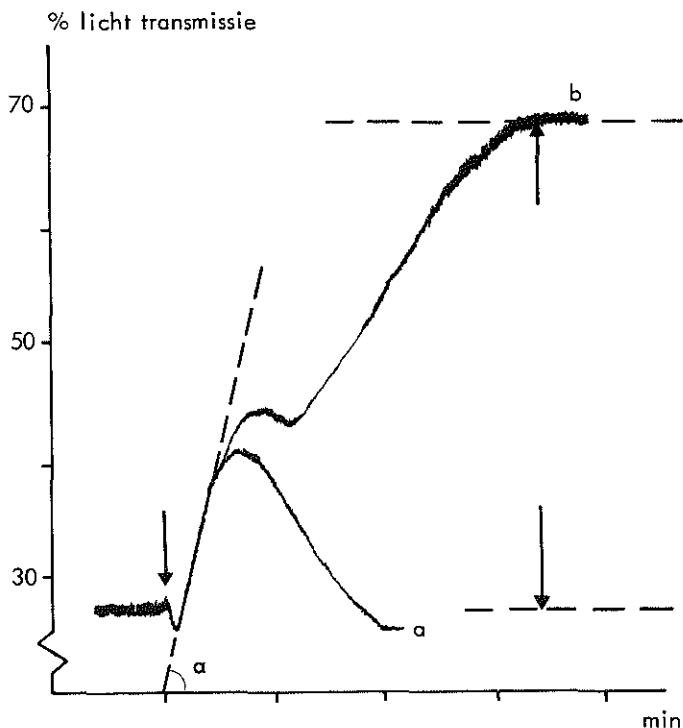
Betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid. De condities waaronder aggregatie wordt gemeten en de als normaal opgegeven waarden blijken in de literatuur aanmerkelijk te verschillen, waardoor onderlinge vergelijking vrijwel onmogelijk is. De betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid

van de methode is afhankelijk van een aantal factoren, die door Sixma (1972) als volgt zijn samengevat.

- Het onderzoek moet plaatsvinden 1-2 uur na afname van het bloedmonster. Thrombocyten kunnen direct in aansluiting aan de venapunctie ADP-refractair zijn door contaminatie met ADP van beschadigde erythrocyten en thrombocyten; hemolyse moet daarom worden vermeden.
- De plaatjessuspensie moet worden bereid uit citraatbloed, door bij een laag toerental (150 x g) te centrifugeren. Gebruik van Na_2 -EDTA voorkomt aggregatie door de sterke chelerende werking, hoewel de vormverandering van de bloedplaatjes normaal optreedt.
- De roersnelheid dient tussen 600-1200 r.p.m. te liggen.
- Het aantal thrombocyten moet 300.000 per μl of meer zijn.
- Het plasmamonster moet worden bewaard bij kamertemperatuur, terwijl de temperatuur van de cuvette in de aggregometer 37°C dient te zijn.
- De patient dient in een periode van 2 weken voorafgaande aan de bepaling geen acetylsalicylzuur bevattende preparaten te hebben gebruikt.
Hieraan kan worden toegevoegd dat lipemisch bloed en de grootte van de cuvette eveneens van invloed zijn op de resultaten.

In de literatuur worden de volgende parameters gebruikt om de ADP aggregatie curve te beschrijven (figuur 3.3.).

- De stijgsnelheid van de curve, uitgedrukt in de tangens of cotangens van de hoek (α).
- Het al dan niet bifasisch verlopen van de curve, d.w.z. het al dan niet opgetreden zijn van de release-reactie.
- De maximale aggregatie (b), meestal aangeduid als OD max. en uitgedrukt in procenten van de maximaal mogelijke lichttransmissie.



Figuur 3.3. De stijgsnelheid van de aggregatiecurve ($\text{tg } \alpha$) en de maximale aggregatie (b). De bovenste curve is bifasisch.

Deze parameters worden steeds gerelateerd aan de verschillende eindconcentraties ADP.

Onder standaardcondities is volgens Sixma (1972) de ADP aggregatiecurve redelijk reproduceerbaar voor wat betreft de maximale OD. De variatie coëfficiënt van de maximale OD bij een 10 x uitgevoerde enkelvoudige bepaling was 3.5; de dag tot dag variatie gedurende 5 opeenvolgende dagen onderzocht bij twee personen was respectievelijk 6 en 7.5 %. Het percentage maximale aggregatie in een groep van 24 normale proefpersonen vertoonde een normale verdeling met een gemiddelde van 35 %.

De laatste jaren bestaat er een toenemende belangstelling voor het fenomeen van de zogenaamde "spontane aggregatie".

Hieronder wordt thans algemeen verstaan dat onder de genoemde standaardcondities spontaan, zonder toevoeging van ADP, aggregatie optreedt (Vreeken en van Aken, 1971). Dit verschijnsel zou vooral optreden binnen de groep van arteriëel thrombotische ziekten en carcinoom patiënten. Wu en Hoak (1976) gingen in een goed opgezet onderzoek na wat de frequentie was van spontane aggregatie bij transient ischaemic attacks (T.I.A.), angina pectoris, acuut myocard infarct en acute perifere arteriele insufficiëntie. In een controlegroep werd nimmer spontane aggregatie gevonden, terwijl bij de genoemde arteriëel thrombotische ziekten in 19 - 80 % van de gevallen spontane aggregatie werd waargenomen. Het tijdsinterval tussen het afnemen van het bloed en de uitvoering van het onderzoek bleek van groot belang te zijn: het verschijnsel van de spontane aggregatie verdwijnt na 2 uur.

Het hier beschreven aggregatie onderzoek met behulp van de aggregometer en ADP in verschillende concentraties lijkt een betrouwbare en gevoelige methode om geïnformeerd te raken over de functie van het bloedplaatje tijdens de zwangerschap. Om deze reden werd de ADP aggregatie in ons onderzoek betrokken.

3.3.2. Bepaling van de thrombocyten aggregatie "in vivo" met behulp van de Filtragometer.

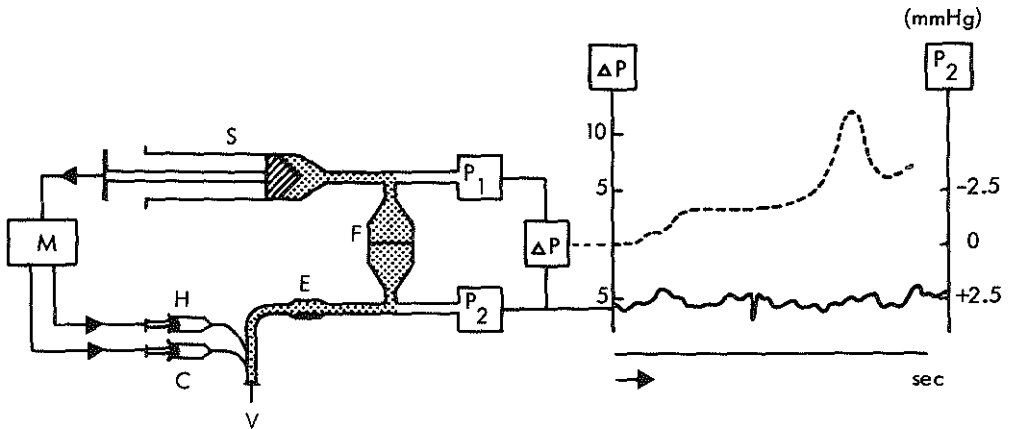
In 1964 ontwikkelde Swank et al. een methode om op meer objectieve wijze dan tot dan toe mogelijk was geweest, in vitro de mate van "sludging", zoals deze in de microcirculatie wordt waargenomen, te bepalen. Bij deze zogenaamde "screen filtration pressure" methode werd de stroomweerstand gemeten die bloed ondervond, wanneer het met een constant volume per tijdseenheid door een filter met microporiën werd gepompt. Deze methode bleek ook bruikbaar te zijn voor het meten van thrombocyten aggregatie (Swank, 1968).

Speciaal voor dit doel werd door Hornstra (1970) een modificatie ontwikkeld, die het mogelijk maakte om bij de rat in de arteriële circulatie spontane of geïnduceerde thrombocyten aggregatie in vivo te meten. Deze zogenaamde "filterloop-techniek" bestaat hieruit, dat een microfilter wordt opgenomen in een in de continuïteit van de aorta abdominalis aangebrachte slang. De bloeddruk vóór en achter het filter wordt continu gemeten. Obstructie van het filter zal een verschil doen ontstaan tussen de druk vóór en die achter het filter, waarbij de grootte van het ontstane drukverschil zal afhangen van de mate van obstructie. Door Hornstra (1970) werd aangetoond dat toevoeging van ADP aan het stromende arteriële bloed vóór het filter obstructie van het filter veroorzaakt door het ontstaan van thrombocyten aggregaten. Na staken van het ADP infuus verdwijnt het door de obstructie veroorzaakte drukverschil weer, er treedt desaggregatie van de bloedplaatjes op het filter op. De mate van thrombocyten aggregatie en dus van het verschil in druk vóór en achter het filter bleek afhankelijk te zijn van de dosis ADP.

Uit eerdere onderzoeken van Hornstra en medewerkers (1971) was de hypothese naar voren gekomen, dat een verhoogde neiging tot thrombose, die dierexperimenteel door toediening van een dieet rijk aan verzadigde vetzuren kon worden verkregen, gepaard zou gaan met een verhoogde neiging tot thrombocyten aggregatie. Deze hypothese kon worden gesteund door de resultaten van de filterloop-techniek (Hornstra en Gielen, 1974), doch niet op grond van bepaling van de thrombocyten aggregatie met behulp van een aggregometer. Dit leidde tot de veronderstelling dat de filterloop-techniek, waarbij direct in vivo wordt gemeten, een gevoeliger methode zou kunnen zijn voor bepaling van plaatjesaggregatie dan de in-vitro meting, waarbij eerst een plaatjessuspensie moet worden bereid.

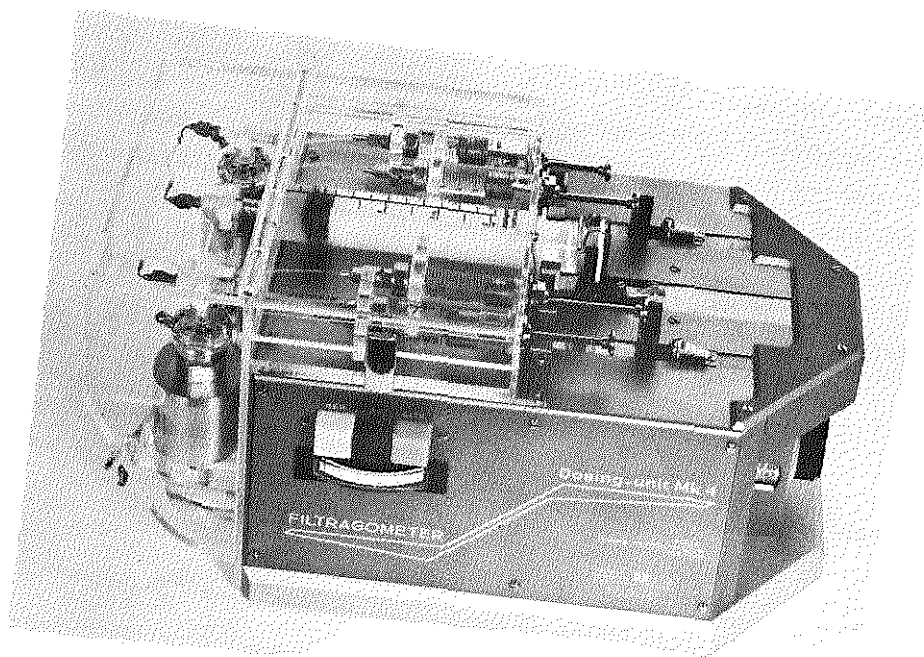
Klinische toepassing van de filterloop-techniek bij de mens, in de vorm waarin deze in het dierexperiment wordt

uitgevoerd heeft bezwaren: een arteriële punctie is een niet ongevaarlijke ingreep, die daarbij veelal vaatspasme met daling van de doorstroming tot gevolg heeft. Daarom werd een veneuze modificatie ontwikkeld, de Filtragometer, die het mogelijk maakt om in veneus bloed "in vivo" thrombocyten aggregatie te meten (Hornstra, ten Hoor, 1975).

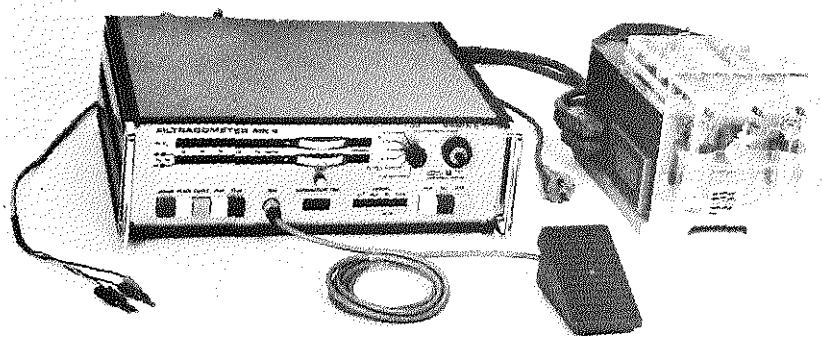


Figuur 3.4. Schematische voorstelling van de Filtragometer.

Figuur 3.4. geeft schematisch weer hoe de Filtragometer is samengesteld. Een door een motor (M) aangedreven 60 ml spuit (S) zuigt met een constante snelheid van 2.0 ml/min bloed aan uit de vena cubiti (V). Tussen de venapunctie-naald en de spuit bevindt zich een mengkamer (E) met een magnetische roerder (1600 r.p.m.) en een nikkelfilter (F) met een doorsnede van 2 mm en microporiën van $20 \times 20 \mu\text{m}$. Door middel van tussengeschakelde driewegkranen zijn druktransducers (P_1 en P_2) opgenomen in het systeem. Het drukverschil ΔP is een maat voor obstructie van het filter; P_2 geeft weer in hoeverre er sprake is van veneuze obstructie. De beide druktransducers zijn gekoppeld aan een twee-kanalige schrijver. Het totale systeem (figuur 3.5. en 3.6.) bevindt zich in een gesloten perspexkamer, waarin de temperatuur thermostatisch op 37°C wordt gehouden.



Figuur 3.5. De Filtragometer MK4.



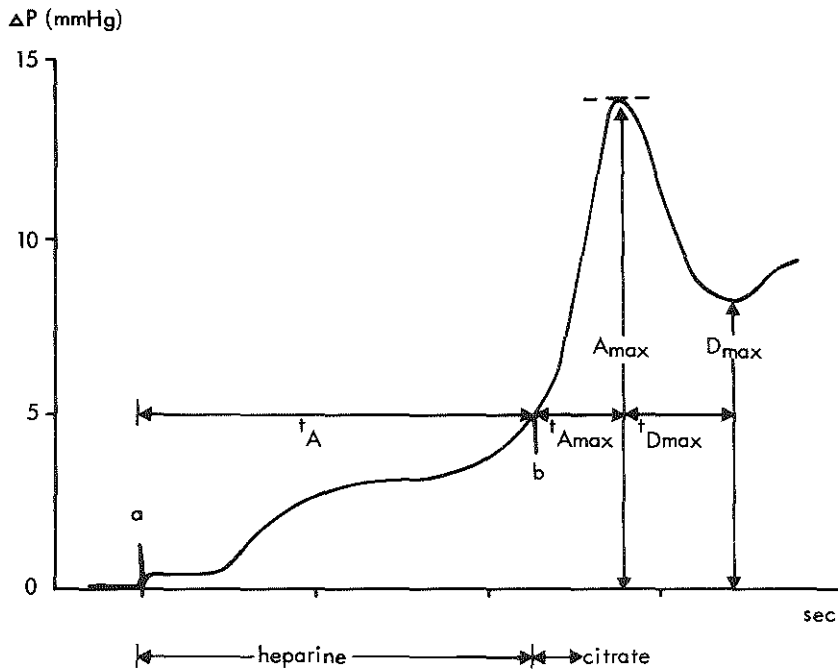
Figuur 3.6. De Filtragometer MK4 in combinatie met de versterker eenheid.

Het aangezogen bloed wordt onstolbaar gemaakt door infusie van heparine (H) in het systeem vlak achter de venapunctie naald, terwijl op dezelfde wijze in plaats van heparine natriumcitraat (C) kan worden geïnfundeerd om desaggregatie op het filter te bewerkstelligen.

Voor één meting is 5-10 ml bloed nodig. Om de bloedplaatjes zo weinig mogelijk te beschadigen is het noodzakelijk dat de venapunctie vlot slaagt, indien mogelijk zonder stuwband; de eerste druppels bloed worden niet gebruikt. Het is eveneens noodzakelijk dat het systeem vrij is van luchtbellen en dat er evenmin een luchtbel wordt meegenomen bij het aansluiten op de punctienaald. Luchtbellen kunnen het filter niet passeren en zouden het effectieve oppervlak van het filter verkleinen, terwijl tevens de mogelijkheid bestaat dat aan het scheidingsvlak bloed - lucht aggregatie wordt geïnduceerd.

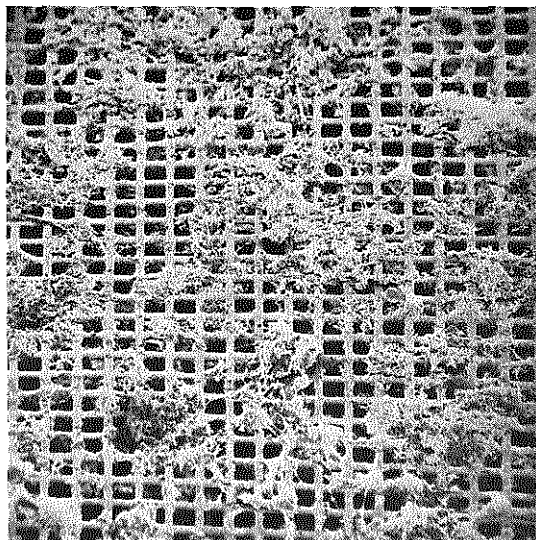
Het gebruik van heparine bij het begin van de meting heeft tot doel om stolling van het aangezogen veneuze bloed te voorkomen en tevens om ervoor te zorgen dat spontane aggregaten worden gestabiliseerd. Zucker (1974) concludeert uit haar in-vitro aggregatie studies met gehepariniseerd bloed, dat heparine de primaire aggregatie versterkt en zelf ook aggregatie induceert door een release-reactie te veroorzaken. Dit zou kunnen betekenen dat daardoor inductie van aggregatie met andere stoffen wordt verhinderd of verminderd. In vivo is het effect van heparine op thrombocyten aggregatie slecht voorspelbaar (Eika, 1973); vooral arteriëel zou door heparine geïnduceerde thrombocyten aggregatie kunnen bijdragen tot het ontstaan van een thrombotisch proces. In de genoemde onderzoeken werd heparine echter toegediend in een dosering, die aanzienlijk hoger lag dan de hoeveelheid die wordt gebruikt bij de filtragometrie.

In figuur 3.7. is een ΔP curve weergegeven, die bij filtragometrie onder normale omstandigheden wordt verkregen. De start van de meting wordt aangegeven door een verticale

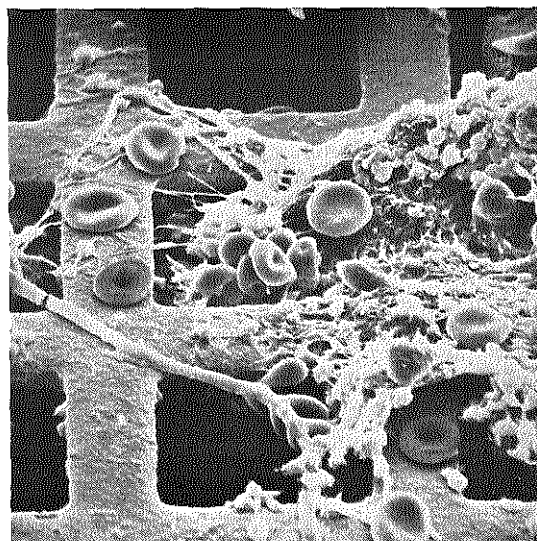


Figuur 3.7. Filtragometercurve zoals deze bij de normale individu kan worden verkregen.

opwaartse lijn (in de figuur aangeduid met de letter a); vanaf dat moment wordt het bloed aangezogen en heparine geïnfundeed. De stijging van de druk als gevolg van obstructie van het filter door thrombocyten aggregaten houdt aan tot het drukverschil ΔP is opgelopen tot 5 mmHg; dit punt is in de curve gemarkeerd door een verticale neerwaartse lijn (in de figuur aangeduid met de letter b). Op dit moment schakelt het apparaat automatisch over op infusie van citraat, waardoor in vele gevallen desaggregatie van reversibele aggregaten op het filter kan worden bewerkstelligd. Het verder oplopen van de ΔP geeft weer, dat er enige tijd nodig is om de heparine te vervangen en om desaggregatie op het filter mogelijk te maken. De desaggregatie wordt aangegeven door het lager worden van ΔP .



Figuur 3.8. Scanning-electronen-microscopische foto van de voorzijde van het filter, waarop tijdens de filtragometrie thrombocyten aggregaten zijn ontstaan (vergroting 200 x).



Figuur 3.9. Detailfoto van figuur 3.8. met thrombocyten aggregaten op de voorzijde van het filter, de grote cellen zijn erythrocyten (vergroting 2000 x).

Scanning-electronenmicroscopisch onderzoek van het filter laat zien dat de afsluiting van de poriën inderdaad wordt veroorzaakt door thrombocyten aggregaten. Figuur 3.8. en 3.9. vertonen een electronenmicroscopische opname van de voorzijde van het filter met plaatjesaggregaten.

Men kan zich afvragen waar de aggregaten worden gevormd. Er zijn aanwijzingen (Hornstra en Haddeman, 1977) dat het gaat om een combinatie van reeds in de circulatie aanwezige spontane aggregaten en van aggregaten die in het systeem worden gevormd als gevolg van specifieke hemorheologische omstandigheden. Uit andere studies is bekend dat bij het dier (Maca et al., 1972 en Jørgensen et al., 1973) en de mens (Haerem, 1974 en Wu en Hoak, 1974) spontane aggregaten kunnen circuleren. Solis (1973) en zijn medewerkers toonden aan dat het aantal grote deeltjes (13 - 80 μm) in de veneuze circulatie sterk toenam door infusie van ADP in de arteria carotis. Dit zou kunnen betekenen dat veneuze aggregaten afkomstig kunnen zijn van arteriëel thrombotische processen.

De volgende parameters worden gebruikt om de filtragometer-aggregatiecurve te beschrijven.

- tA, de aggregatietijd, de tijd in seconden die nodig is om een ΔP van 5 mmHg op te bouwen. Deze tijd dient tenminste 40 seconden te zijn. Dit is namelijk de tijd die noodzakelijk is om, bij de gebruikelijke lengte van het systeem, dit tot op het filter met bloed te vullen. Een kortere tijd moet worden beschouwd als een artefact.
- Amax, de maximale aggregatie, dat is de maximale hoogte van de aggregatiecurve in mmHg.
- Dmax, de maximale desaggregatie, eveneens weergegeven in mmHg.
- tAmax, de tijd in seconden die nodig is om maximale aggregatie te bereiken, gerekend vanaf de infusie van citraat.

tDmax, de tijd in seconden die verloopt tussen maximale aggregatie en maximale desaggregatie.

Klinische toepassing en reproduceerbaarheid. De Filtragometer wordt verondersteld thrombocyten aggregatie te meten, uitgedrukt in de hierboven genoemde parameters. Het zou daarbij mogelijk moeten zijn om te differentiëren tussen een vermeerderde aggregatie, zoals die bijvoorbeeld uit in-vitro aggregatie metingen bekend is bij arterieel thrombotische ziekten, en een verminderde aggregatie, zoals bij bepaalde hematologische ziekten (bijvoorbeeld bij de ziekte van Glanzmann of uraemie) of na het gebruik van acetosal wordt waargenomen. Inderdaad resulteert het gebruik van acetosal door een proefpersoon in een significante toeneming van tA en een daling van Amax, dus in een verminderde in-vivo aggregatie (Hornstra en ten Hoor, 1975). Hornstra et al. (1973) onderzochten met de Filtragometer eveneens patiënten met een arterieel thrombotisch proces in de vorm van coronaire ziekte. In een groep patiënten met hoge mortaliteit vonden zij een significant lagere tA en hogere Amax, d.w.z. een hogere aggregatie neiging, dan in een groep met lage mortaliteit. Ook Fleischman en medewerkers (1975a en b) vonden significante veranderingen in de filtragometrie parameters in de zin van vermeerderde aggregatie bij patiënten met verhoogde thrombose neiging. In enkele van de hier besproken studies werd de filtragometrie vergeleken met een andere thrombocytenfunctietest, echter nimmer met een standaard aggregometer onderzoek.

Het is gebleken dat geen van de parameters van de filtragometrie significant is gecorreleerd aan leeftijd, lichaamsgewicht, rookpatroon, bloeddruk, serum cholesterolgehalte, bloedingtijd, hematocriet en thrombocytenaantal (Hornstra en ten Hoor, 1975). Desondanks blijkt de reproduceerbaarheid van de resultaten van de filtragometrie binnen één en dezelfde persoon matig te zijn; slechts de

tA levert een goed reproduceerbaar criterium. De spreiding van de andere parameters wordt mogelijk veroorzaakt door wisseling in de aggregatie neiging van de thrombocyten.

Met behulp van de Filtragometer kunnen op betrekkelijk eenvoudige en voor de patient weinig belastende wijze kwantitatieve gegevens worden verkregen over de plaatjes-aggregatie. Vooral het feit dat de bepaling direct bij de patient in stromend bloed wordt verricht ("in vivo") biedt voordelen boven de ingewikkelder in-vitro methode met ADP in de aggregometer. De gevoeligheid van deze direkte aggregatie methode bij klinische toepassing lijkt dermate groot te zijn, dat de door ons veronderstelde arteriële thrombose neiging bij zwangeren hiermee zou kunnen worden vastgesteld.

3.4. Bepaling van de levensduur van thrombocyten.

Zowel de differentiële diagnostiek alsook de verklaring van de pathogenetische mechanismen bij thrombocytopeniën en thrombocytopathiën steunt voor een belangrijk deel op onderzoek van de thrombokinetiek. Een vermindering van het aantal thrombocyten kan een immunologische oorzaak hebben of worden veroorzaakt door een toegenomen consumptie. Deze laatste situatie doet zich voor bij diffuse intravasale stolling of als resultaat van thrombotische processen in een abnormaal vaatbed.

Harker en Slichter (1972) hebben in een uitgebreide studie de rol onderzocht, die thrombocyten spelen in de verschillende vormen van thrombotische processen. Zij toonden onder meer aan dat er een positieve correlatie bestaat tussen arteriële thrombose en verkorting van de levensduur van bloedplaatjes, die kan worden verklaard door consumptie van thrombocyten tijdens de vorming van de thrombi. De bepaling van de levensduur van thrombocyten is op dit moment de enige methode die een direct inzicht kan verschaffen in de kinetische aspecten van de functie

van thrombocyten bij het ontstaan van thrombotische ziekteprocessen.

De levensduur van thrombocyten kan klinisch op twee verschillende manieren worden bepaald:

- met behulp van toediening van radioisotoop gemerkte autologe of heterologe thrombocyten;
- met behulp van een methode die gebruik maakt van het effect van acetosal op thrombocyten.

3.4.1. Bepaling van de levensduur van thrombocyten met behulp van met ^{51}Cr gemerkte bloedplaatjes.

Aan de proefpersoon wordt een hoeveelheid radioactief gelabelde bloedplaatjes toegediend, waarna vervolgens het verdwijnen van het label over een zeker tijdsverloop wordt gemeten. Aangenomen dat de gemerkte thrombocyten zich gedragen als ongemerkte kan dan uit de verdwijningscurve de thrombocyten overlevingsduur worden bepaald. Men kan gebruik maken van gelabelde plaatjes afkomstig van de proefpersoon zelf (autologe thrombocyten) of van andere individuen (heterologe thrombocyten). Als label wordt ^{51}Cr natriumchromaat algemeen het meest geschikt geacht (Aas en Gardner, 1958). Voor een uitgebreide beschrijving van de methode en van de voorwaarden waaraan moet worden voldaan om tot een voor de kliniek aanvaardbare mate van betrouwbaarheid te komen wordt verwezen naar de proefschriften van de Maat (1969) en de Koning (1975). Onder normale omstandigheden wordt bij gezonde, jonge volwassenen een thrombocyten overlevingsduur gemeten van 8-11 dagen (de Maat, 1969). De reproduceerbaarheid van de methode is zeer goed.

Wegens de algemeen bestaande -en naar onze mening terecht- aarzeling om aan een zwangere vrouw radioactief materiaal toe te dienen is de overlevingsduur van ^{51}Cr thrombocyten bij zwangeren nimmer bepaald. De uit de literatuur naar voren komende angst voor een mogelijk hoge foetale stralingsdosis is voor wat betreft ^{51}Cr -thrombocyten temeer

begrijpelijk, omdat tot voor kort geen gegevens bekend waren over de vraag of thrombocyten en ^{51}Cr -ionen al dan niet de hemochoriale placenta kunnen passeren en omdat daarom geen betrouwbare schatting kon worden gemaakt van de stralingsbelasting voor de foetus. Om deze vraag te beantwoorden werd door ons een onderzoek verricht met autologe ^{51}Cr -gelabelde thrombocyten bij zwangere rhesus apen, waarvan het verslag als appendix aan dit proefschrift is toegevoegd.

Uit dit onderzoek blijkt dat, onder de condities van de betreffende experimentele opstelling, geen overgang van met ^{51}Cr gemerkte bloedplaatjes via de hemochoriale placenta werd waargenomen. Wel werd bij de foetus radioactiviteit in het plasma aangetoond, veroorzaakt door transplacentaire passage van vrije ^{51}Cr -ionen. Op grond van extrapolatie van de dierexperimenteel verkregen gegevens naar de mens kan worden geschat dat de foetale stralingsdosis bij toediening van de gebruikelijke hoeveelheid van $20\ \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr -gemerkte thrombocyten aan een zwangere vrouw, bij een foetaal gewicht van 1700 gram -ongeveer overeenkomend met de 31e zwangerschapsweek- ongeveer 7 mrem zal bedragen. Deze dosis zal lager worden bij een toenemend gewicht van de foetus.

Ondanks het dus waarschijnlijk geringe stralingsrisico voor de foetus in utero hebben wij toch gemeend voor ons onderzoek van deze techniek te moeten afzien, en wel omdat -zeker bij gezonde proefpersonen- zelfs een mogelijk klein risico niet aanvaardbaar is. Daarbij komt dat voor de bereiding van een autologe ^{51}Cr -gemerkte plaatjessuspensie 450 ml vol bloed nodig is. Hoewel de erythrocyten weer kunnen worden teruggegeven, kan het afnemen van een dergelijke hoeveelheid bloed voor sommige zwangeren toch bezwaarlijk zijn.

3.4.2. Bepaling van de levensduur van thrombocyten met behulp van het acetosal-effect.

In 1955 beschreef Beaumont veranderingen in de hemostase bij mensen, die tevoren acetosal hadden gebruikt. Voordien werd gedacht dat acetosal uitsluitend een lokaal effect uitoefent; het gebruik van Aspergum (kauwgum met acetosal) veroorzaakte namelijk nabloedingen bij kiesextracties (Singer, 1945). Pas vele jaren later onderzochten O'Brien (1968) en Weiss et al. (1968) de werking die acetosal uitoefent op thrombocyten in vitro. Zij constateerden dat de release-reactie (tweede fase aggregatie), die normaliter optreedt na inductie met ADP of collageen, achterwege blijft in aanwezigheid van acetosal. In vivo veroorzaakt acetosal bij normale personen een geringe verlenging van de bloedingstijd; deze wordt echter veel duidelijker verlengd bij patiënten met een stollingsdefect (Kaneshiro et al., 1969). Dit effect van acetosal treedt reeds op bij zeer lage plasmaspiegels, die worden bereikt met een eenmalige dosis van 300-600 mg.

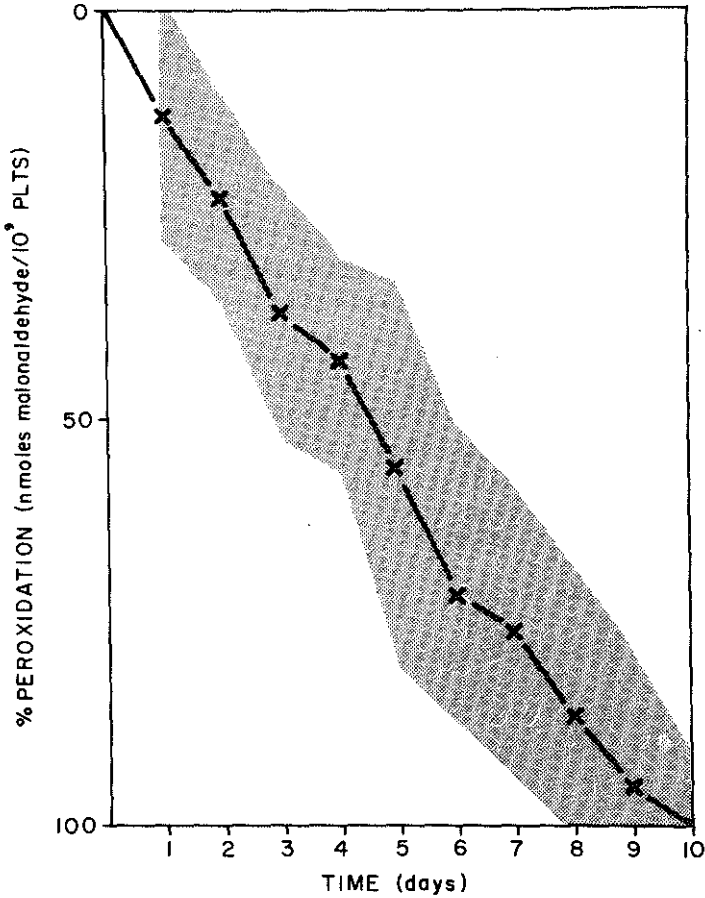
Smith en Willis (1971) toonden aan dat acetosal, evenals in vele andere weefsels (Vane, 1971), ook in thrombocyten de vorming van prostaglandines remt. Zij veronderstelden dat hiermee het typische effect van acetosal op de release-reactie kan worden verklaard. In latere jaren werd in toenemende mate inzicht verkregen in de ingewikkelde synthese van prostaglandines in bloedplaatjes en in het mechanisme van de invloed die acetosal hierop heeft. In de volgende alinea's zal hierop eerst in het kort worden ingegaan, aangezien de methode van bepaling van de levensduur van thrombocyten met behulp van het acetosal-effect hiermee ten nauwste samenhangt.

De invloed van acetylsalicylzuur (acetosal) op de synthese van prostaglandines. De eerste stap in de synthese van prostaglandines in de thrombocyt wordt, evenals in andere lichaamscellen, gevormd door het vrijkomen uit de membraan

levensduur van het bloedplaatje bestaan (Majerus, 1976). Reeds in 1968 werd door O'Brien gesteld dat de specifieke beschadiging van de bloedplaatjes door acetosal permanent is. Het feit, dat de in-vitro aggregatietest na toediening van acetosal in de loop van de volgende dagen normaal wordt, verklaarde hij door aan te nemen dat nieuwe, niet-geacetylerde plaatjes in de circulatie komen. Schwartz (1974) trachtte van dit gegeven gebruik te maken om de levensduur van thrombocyten te bepalen. Na een enkelvoudige dosis acetosal voerde hij dagelijks een ADP-aggregatie uit, doch deze techniek bleek onvoldoende gevoelig om na de vijfde dag nog een acetosal-effect te kunnen aantonen. Een meer gevoelige methode zou kunnen zijn het meten van de cyclische prostaglandine endoperoxiden. Deze methode is echter, mede in verband met de zeer korte halfwaarde tijd, niet geschikt voor routine-onderzoek. Zoals gezegd gaat de omzetting van arachidonzuur in prostaglandines gepaard met de vorming van *malondialdehyde* (figuur 3.10.). De uit de prostaglandine endoperoxiden ontstane hoeveelheid malondialdehyde is gelijk aan de hoeveelheid hydroxy C-17 zuur die wordt gevormd (Haddeman, 1976) en wordt evenredig geremd door toediening van acetosal. Het bleek dat malondialdehyde betrekkelijk eenvoudig chemisch kan worden bepaald (Okuma e.a., 1970; 1971). Stuart en haar medewerkers (1974) zijn de eersten geweest die van het verschijnsel van de remming van de vorming van malondialdehyde door acetosal gebruik hebben gemaakt om de levensduur van thrombocyten te meten.

Bepaling van de levensduur van thrombocyten via de remming van de vorming van malondialdehyde (MDA) door acetosal. Stuart et al. (1975) bepaalden de thrombocyten levensduur bij 8 normale proefpersonen. Na een eenmalige dosis van 600 mg acetosal werd dagelijks een monster citraat-bloed afgenomen. Hieruit werd een bloedplaatjessuspensie bereid, waaraan thrombine werd toegevoegd om aggregatie te induceren.

Na beëindiging van de aggregatie werd de hierbij vrijgekomen hoeveelheid malondialdehyde (MDA) bepaald. Zoals is te zien in figuur 3.12. bleek de kort na toediening van acetosal minimale hoeveelheid MDA in het verloop van de volgende dagen toe te nemen, tot na 8 tot 11 dagen een maximum werd bereikt.



Figuur 3.12. Levensduur van thrombocyten bepaald volgens de acetosal-
methode bij 8 normale individuen (vlg. Stuart et al.,
1975).

Aangezien, zoals tevoren is uiteengezet, acetosal de vorming van MDA door de thrombocyten gedurende de gehele

Levensduur van deze cellen blokkeert, geeft de in de dagen volgend op de toediening van acetosal toenemende hoeveelheid MDA aan, dat er nieuwe, niet-geacetylerde bloedplaatjes door de megakaryocyten zijn gevormd en in circulatie gekomen. Wanneer de hoeveelheid gevormd MDA niet meer verder toeneemt mag worden aangenomen, dat alle oude, door acetyl geblokkeerde, bloedplaatjes uit de circulatie zijn verdwenen. Uitgaande van een evenwichts-situatie, waarin evenveel nieuwe thrombocyten in circulatie komen als er oude verdwijnen, valt de tijd die nodig is om na toediening van acetosal weer een maximale vorming van MDA te bereiken samen met de levensduur van de thrombocyten.

Het principe van de methode om MDA te bepalen door middel van een kleurreactie werd reeds in 1944 door Kohn aangegeven. Okuma en medewerkers (1970; 1971) hebben deze kleurreactie voor bloedplaatjes nader uitgewerkt. Het bij de, door thrombine geïnduceerde, plaatjesaggregatie gevormde MDA wordt gefixeerd en gekleurd door toevoegen van thiobarbituurzuur (TBA); bij de reactie tussen MDA en thiobarbituurzuur ontstaat een roze pigment. De extinctie van de roze vloeistof wordt in een spectrofotometer bij 532 nm afgelezen en de hoeveelheid MDA wordt berekend in nmol MDA per 10^9 thrombocyten.

Betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid. Uit de literatuur blijkt, dat de betrouwbaarheid en de reproduceerbaarheid van de acetosalmethode ter bepaling van de levensduur van bloedplaatjes afhankelijk is van een aantal factoren, die kort zullen worden besproken.

- Het gebruikte coagulans. Volgens Okuma et al. (1970) is de correlatie tussen het aantal plaatjes en de MDA opbrengst niet lineair-positief voor met ACD (acid-citrate-dextrose) bewerkte bloedplaatjes, terwijl dit verband wel lineair is bij bloedplaatjes waarbij de bewerking plaatsvond in EDTA. De relatief

lagere MDA opbrengst bij een hogere concentratie van ACD plaatjes zou kunnen worden verklaard door het optreden van kleine aggregaten, zodat groepjes thrombocyten niet meer meedoen aan de reactie. EDTA is als krachtig chelerende stof in staat om alle calciumionen weg te vangen, waardoor aggregatie wordt voorkomen.

- Het milieu van de bloedplaatjessuspensie. Okuma et al. (1970; 1971) en Stuart (1975) gebruiken een techniek waarbij de thrombocyten worden geresuspendeerd in een tris-buffer, waaraan al dan niet fysiologisch zout is toegevoegd. Dit betekent dat vooraf al het plasma is verwijderd, zodat in de suspensie de voor ADP aggregatie noodzakelijke cofactor fibrinogeen afwezig is. Onlangs hebben Smith et al. (1976) aangetoond dat de MDA bepaling ook goed kan worden uitgevoerd in plaatjesrijk plasma, wat het voordeel heeft dat de plaatjes in een meer fysiologisch milieu blijven.
- De gebruikte aggregatie-inducerende stof. Door Okuma (1971) is onderzocht onder welke omstandigheden en door welke prikkels in thrombocyten cyclische prostaglandine endoperoxiden, uitgedrukt in MDA, worden gevormd. Het bleek dat de reactie autokatalytisch kan verlopen of ook kan worden geïnduceerd door onder andere thrombocyten antilichamen, latexdeeltjes, ijzerionen, en thrombocyten aggregerende stoffen. Bij geresuspendeerde plaatjes werd een optimale MDA opbrengst verkregen door inductie van de aggregatie met thrombine; de vorming van MDA bleek vrijwel direct en maximaal plaats te vinden bij pH 7.4, terwijl de reactie in zuurder milieu trager verliep en met een lagere opbrengst aan MDA. De hoeveelheid thrombine in verhouding tot het aantal bloedplaatjes is ook van belang; Okuma (1971) constateerde dat een maximale productie van MDA optrad bij gebruik van 10

I.E. thrombine per ml plaatjessuspensie. Okuma ver-
richtte alle bepalingen in suspensies met 3.10^9
thrombocyten per ml.

Mogelijke bijwerkingen van acetosal bij de zwangere en de foetus. In verband met het voorafgaande doet zich de vraag voor, in hoeverre toediening van acetosal bezwaarlijk zou kunnen zijn, zowel voor de zwangere zelf als voor haar ongeboren of geboren kind.

Het merendeel van de bijwerkingen van acetosal is het gevolg van intoxicatie na gebruik van hoge doses of door langdurig gebruik. Bekend zijn de gastro-intestinale verschijnselen die hierbij optreden: misselijkheid, dyspepsie en bloedingen. Minder bekend en zeldzamer is de, waarschijnlijk verworven, overgevoeligheid voor het middel, die gepaard gaat met hoesten, benauwdheid en rhinorhoe. Ernstige vormen van acetosal sensibilisatie gaan gepaard met plotse-linge pijn in de borst, bronchospasme, cyanosis en shock. Dit betreft veelal personen van 30-40 jaar, die last hebben van rhinitis, polyposis nasi en andere chronische neusklachten (Cohen, 1976).

De door acetosal veroorzaakte remming van de thrombocyten aggregatie zou tot problemen kunnen leiden bij patiënten met een verhoogd risico voor het optreden van bloedingen. Tot deze groep behoort zeker ook de zwangere; bij een onverwacht op gang komen van de partus of bij het ontstaan van een complicatie, zoals placenta praevia, zou de verlengde bloedingstijd een zeker risico met zich kunnen meebrengen. Bij de selectie van patiënten voor ons onderzoek werd met dit probleem rekening gehouden.

Acetylsalicylzuur heeft een hoge vetoplosbaarheid, waardoor het gemakkelijk door de placenta diffundeert (Goodman en Gilman, 1970). Jackson (1948) toonde passage van natrium-salicylaten via de hemochoriale placenta van ratten en konijnen aan, door de zwangere dieren verschillende doses subcutaan toe te dienen. De foetale, evenals de maternale,

serumspiegel bereikte een maximum na 2 uur; de foetale serum concentratie bedroeg meer dan de helft van de maternale serum concentratie. Het metabolisme en de excretie van acetosal bij de foetus verschilt van dat bij de moeder. Levy en Garrettson (1974) onderzochten het navelstrengbloed van pasgeborenen van moeders die op de dag van de partus acetosal hadden gebruikt en vonden een hogere foetale serum salicylaat concentratie (0.83-3.08 mg/100 ml), in vergelijking met de gelijktijdig bepaalde maternale serumconcentratie (0.2 - 2.67 mg/100 ml). Tot 3 dagen post partum werden bij deze pasgeborenen salicylaten in de urine aangetoond.

Onlangs hebben Slone en medewerkers (1976) de resultaten gepubliceerd van een prospectief onderzoek, waarin werd nagegaan of het gebruik van acetosal gedurende de eerste vier maanden van de zwangerschap een nadelige invloed heeft op de vrucht. Het onderzoek betrof 50.282 zwangeren en hun kinderen. Uit dit onderzoek bleek, dat het percentage kinderen met congenitale afwijkingen geboren uit 35.418 zwangeren die géén aspirine hadden gebruikt, even groot was als dat in de groep van 9.736 vrouwen die een matig gebruik van aspirine hadden gemaakt en ook als dat bij 5128 zwangeren die langdurig acetosal hadden gebruikt. Als -gering-bezwaar tegen dit onderzoek kan worden aangevoerd dat niet wordt opgegeven in welke dosering het acetylsalicylzuur werd gebruikt, maar uitsluitend het aantal dagen gedurende welke het middel werd ingenomen. Door dezelfde groep onderzoekers (Shapiro et al., 1976) werd gevonden dat gebruik van acetosal in latere maanden van de zwangerschap, in verschillende doseringen, géén invloed had op het geboortegewicht van het kind of op de perinatale mortaliteit.

Over het effect van kort voor de baring aan de moeder toegediende acetosal op de thrombocyten aggregatie van de pasgeborene is in de literatuur weinig te vinden. Uit de spaarzame literatuur gegevens blijkt dat de thrombocyten-

functie tests bij de pasgeborene op dezelfde wijze veranderen als bij de volwassene na gebruik van acetosal. Bleyer en Breckenbridge (1970) toonden een verlaagde thrombocyten aggregatie na collageeninductie aan bij neonaten, waarvan de moeders in de week voorafgaande aan de partus aspirine hadden gebruikt; dit werd bevestigd door Corby en Schulman (1971). Of het effect geheel toegeschreven moet worden aan acetosal is echter niet duidelijk omdat gebleken is, dat het aggregatiepatroon van foetale thrombocyten afwijkt van dat van de volwassen thrombocyten aggregatie (Corby en Schulman, 1971; Casteels et al., 1972; TsAo et al., 1976). Met name bestaat er een minder uitgesproken thrombocyten aggregatie bij inductie met collageen, ADP en adrenaline. Corby en Schulman (1971) menen dat het gebruik van aspirine door de moeder vlak voor de baring, voor de neonatus tot gevolg heeft dat de reeds verminderde aggregatie door het acetosal effect nog minder wordt. Overigens werd door deze onderzoekers in de kleine groep (10 vrouwen) met aspirinegebruik geen pasgeborene waargenomen met klinische verschijnselen van een bloeding.

Door Haslam et al. (1974) werd een geval beschreven van een pasgeborene met een ernstige gastrointestinale bloeding ten gevolge van een gestoorde thrombocytenfunctie. De moeder had gedurende de laatste drie dagen van de zwangerschap in totaal 2700 mg calcium acetylsalicylzuur gebruikt. De ADP- en adrenaline aggregatie uitgevoerd met navelstrengbloed vertoonde een afwijkend patroon met uitblijven van de tweede fase aggregatie; drie weken na de geboorte was de aggregatie genormaliseerd. De door deze zwangere gebruikte dosis was echter aanzienlijk hoger dan de door ons voorgestelde eenmalige dosering.

Uit de aangehaalde literatuurgegevens konden wij geen argumenten destilleren, op grond waarvan de voor ons onderzoek noodzakelijke eenmalige toediening van 500 mg acetosal aan de zwangere vrouw ontoelaatbaar zou moeten

3.4.3. Vergelijking van de twee methoden ter bepaling van de levensduur van thrombocyten.

Via de acetosal-methode wordt de levensduur van bloedplaatjes niet direct, doch indirect gemeten. Men herkent via de MDA bepaling immers slechts niet-geacetylerde bloedplaatjes, wat betekent dat alleen jonge, nieuw in de circulatie komende bloedplaatjes worden bepaald en dat het verkregen resultaat een maat is voor de vernieuwing van het plaatjesbestand. Zoals besproken, is in een steady state situatie het aantal thrombocyten dat in circulatie komt gelijk aan het aantal dat uit de circulatie verdwijnt, zodat de thrombocyten "verjongingscurve" zal samenvallen met de overlevingscurve.

Met de ^{51}Cr techniek wordt precies het tegenovergestelde gemeten, namelijk het verdwijnen van gemerkte bloedplaatjes uit de circulatie. Tegen deze techniek kan worden ingebracht, dat er een aantal niet-fysiologische handelingen moet worden verricht om het bloedplaatje te merken, alvorens tot bepaling kan worden overgegaan. Initiele sequestratie van de gemerkte plaatjes komt voor en moet altijd worden gecontroleerd korte tijd na het inspuiten van de ^{51}Cr plaatjessuspensie (de Maat, 1969).

Tegen de acetosal-methode kan als bezwaar worden aan-gevoerd dat een middel wordt gebruikt, dat mogelijk de levensduur van thrombocyten zou kunnen beïnvloeden. Acetosal remt de aggregatie irreversibel, wat betekent, dat geacetylerde bloedplaatjes geen aggregaten kunnen vormen en dus niet zullen worden "verbruikt". Wanneer toediening van een enkelvoudige dosis van 500 mg acetosal inderdaad de levensduur van thrombocyten meetbaar zou beïnvloeden, zou dit, via dit mechanisme, dus moeten zijn in de zin van een verlenging. In de literatuur zijn hierover slechts enkele gegevens te vinden. Evans et al. (1968) vonden bij ratten een aanzienlijke toeneming van de gemiddelde levensduur van thrombocyten na toediening van acetosal, waarbij de toeneming evenredig was met de toegediende dosis aceto-

sal. De door deze onderzoekers gebruikte isotopentechniek wijkt af van de standaard ^{51}Cr -methode en het onderzoek is nimmer door anderen herhaald. Harker en Slichter (1974) hebben een uitgebreid onderzoek gedaan bij grote groepen patiënten met veneuze of arteriële thrombose en daarbij het effect nagegaan van acetosal op de trombocyten overlevingsduur bepaald met behulp van ^{51}Cr . Zij vonden dat de plaatjes overlevingsduur bij patiënten met een arteriële thrombotische ziekte aanzienlijk verkort was (gemiddeld 4.4 dagen) en dat deze door dagelijkse medicatie met 4 g acetosal niet veranderde (gemiddeld 4.7 dagen). Bij dezelfde patiënten werd wel een opmerkelijke verlenging van de plaatjesoverlevingsduur tot gemiddeld 8.9 dagen verkregen, wanneer acetosal werd gecombineerd met dipyridamol. Ook in een controlegroep van 35 normale personen werd de met ^{51}Cr bepaalde overlevingsduur van trombocyten niet beïnvloed door dagelijkse toediening van 4 g acetosal. Abrahamsen et al. (1974) zag geen verandering in de ^{51}Cr -thrombocyten overlevingsduur bij 9 atherosclerotische patiënten, die hij met 1 g aspirine per dag behandelde. Tenslotte werden door Stuart e.a. (1975) een aantal bepalingen van de trombocyten levensduur uitgevoerd, gelijktijdig met de ^{51}Cr - en met de acetosal-methode. Bij drie patiënten met chronische idiopathische trombocytopenie verkreeg zij een identieke overlevingsduur. De auteurs vermelden niet of de acetosal werd ingenomen vóór, tijdens of ná de procedure van het labelen van de plaatjes met ^{51}Cr ; dit zou namelijk van invloed kunnen zijn omdat mag worden verwacht, dat het afnemen van 450 ml bloed de "steady state" zal verstoren.

Op grond van het hier beschreven literatuuroverzicht kan worden geconcludeerd, dat de acetosal-methode het mogelijk maakt om op betrouwbare en voor de zwangere weinig belastende wijze de levensduur van trombocyten in de zwangerschap te bepalen. Deze methode kan belangrijke informatie geven over de thrombokinetiek tijdens de zwangerschap,

informatie die niet in de literatuur kan worden gevonden en die essentieel is in het kader van de hypothese van het bestaan van een arteriëel thrombotisch proces in de zwangerschap.

3.5. Conclusie.

In dit hoofdstuk werd een aantal methoden besproken ter bepaling van trombocytenfuncties, waarmee een mogelijk bij de zwangere bestaand arteriëel thrombotisch proces zou kunnen worden aangetoond.

De bepaling van de bloedingstijd heeft, naast een aantal bezwaren samenhangend met de uitvoering van de test, vooral een indicatie gebied bij het onderzoek naar stoornissen in de hemostase, vooral bij bloedingen die worden veroorzaakt door een intrinsieke afwijking van de bloedplaatjes. Daarentegen geeft de bloedingstijd geen informatie over de pathologische functie van het bloedplaatje tijdens het ontstaan van thrombose.

De gangbare methoden ter bepaling van de adhesiviteit van bloedplaatjes lijken onvoldoende gevoelig om de geringe veranderingen, die in de zwangerschap zouden kunnen worden verwacht, aan te tonen.

De bepaling van de trombocyten aggregatie, zowel in vitro als in vivo, kan worden gezien als een over-all methode, die bij een onderzoek naar de pathofysiologie van zowel de hemostase als van thrombose van waarde is. De beperking van deze methode wordt vooral bepaald door de methodologische variaties, waardoor onderlinge vergelijking van de resultaten nauwelijks mogelijk is.

Bij het onderzoek van arteriëel thrombotische processen neemt de bepaling van de trombocyten overlevingsduur een belangrijke plaats in. De ⁵¹Cr-plaatjes methode is de meest gebruikte; toediening van radioisotopen aan zwangeren is echter bezwaarlijk. Een geheel nieuwe techniek, waarbij gebruik wordt gemaakt van het acetosal-effect op trombocyten, biedt een goed alternatief om de levensduur van

thrombocyten in de zwangerschap te bepalen.

Op grond van de in dit hoofdstuk naar voren gebrachte overwegingen werden in ons onderzoek de volgende methoden toegepast:

- Bepaling van de thrombocyten *aggregatie* met behulp van de *aggregometer* en de *Filtragometer*.
- Bepaling van de *levensduur* van thrombocyten met behulp van de *acetosaal-methode*.

HOOFDSTUK 4.

CRITERIA VOOR DE SELECTIE VAN PATIENTEN EN PROEFPERSONEN.

De patiënten en proefpersonen, die bij het onderzoek waren betrokken, werden tevoren geselecteerd op grond van een aantal criteria, die in dit hoofdstuk nader worden besproken. Niet alle personen, die in de periode waarover het onderzoek zich uitstreckte aan de gestelde criteria bleken te voldoen, werden in het onderzoek opgenomen. De uiteindelijke selectie vond plaats op grond van de laboratorium mogelijkheden. Het onderzoek vond plaats bij zwangeren en niet-zwangeren, die allen op vrijwillige basis aan het onderzoek meededen, nadat het doel in begrijpelijke termen was uiteengezet.

4.1. Onderzoek bij zwangeren.

Groep A: ongestoorde zwangerschap.

Het onderzoek werd verricht bij zwangeren die werden gecontroleerd op de Obstetrische Polikliniek van het A.Z.R.-Dijkzigt. Alleen zwangeren die voldeden aan de volgende voorwaarden werden in het onderzoek betrokken:

- Kaukasisch ras
- leeftijd 18-35 jaar
- anamnestiche geen gebruik van acetylsalicylzuur in de aan het onderzoek voorafgaande 2 weken
- geen belastende anamnese voor thrombose of afwijkingen in de hemostase
- een zekere zwangerschapsduur, variërend van 32-40 weken.

De zwangerschapsduur werd zeker geacht op grond van:

- zekere laatste menstruatiedatum
- regelmatige cyclus
- orale anticonceptie tenminste 3 maanden voor de laatste menstruatie gestaakt

- fundus uteri hoogte passend bij de duur van de amenorrhoe
- fysiologisch verlopende zwangerschap, zonder positieve of negatieve discongruentie, zonder hypertensie (zie gestoorde zwangerschap)
- tenminste tweemaal bepaalde lever- en nierfuncties (zie paragraaf 5.6.) met normale waarden volgens de criteria van het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium (CKCL) - Dijkzigt.
- geboorte van een levend kind zonder congenitale misvormingen en met een geboortegewicht > 10e percentiel van de normale gewichtscurve. Wanneer aan dit criterium niet werd voldaan werd de betreffende zwangere alsnog uit de steekproef verwijderd. Wanneer in het vervolg wordt gesproken over percentielen, worden uitsluitend bedoeld de percentielen van de gewichtscurven van Kloosterman (1970).

Groep B, C en D: gestoorde zwangerschap.

Dit betrof voornamelijk zwangeren die waren opgenomen op de afdeling Pathologische Obstetrie van het A.Z.R.-Dijkzigt.

De gestoorde zwangerschap werd onderverdeeld in:

Groep B) *hypertensieve* zwangerschap met normaal geboortegewicht

Groep C) *te laag geboortegewicht* zonder hypertensie

Groep D) *hypertensieve* zwangerschap met *te laag geboortegewicht*.

- *hypertensieve zwangerschap*: de bij ons onderzoek gehanteerde voorwaarde voor hypertensieve zwangerschap was een diastolische bloeddruk van 95 mmHg of hoger, in zittende houding tenminste tweemaal gemeten met een tijdsinterval van 24 uur. Als diastolische bloeddruk werd gerekend het punt waarop de vaattonen duidelijk zachter werden. De waarneming van proteïnurie of oedeem ondersteunde de diagnose, maar was niet obligaat.

- *te laag geboortegewicht*: de voorwaarde voor deelneming aan deze groep werd bij een zekere zwangerschapsduur gesteld op grond van het klinische onderzoek, waarbij sprake moest zijn van een negatieve discongruentie van tenminste 3 weken. In vele gevallen werd de diagnose ondersteund door echoscopische meting van de D.B.P. en het oppervlak van de thoraxdoorsnede (Wladimiroff et al., 1977). De definitieve opname in deze groep vond plaats wanneer bleek dat het geboortegewicht minder was dan de 10e percentiel van de gewichtscurve.

4.2. Onderzoek bij niet-zwangeren.

Dit betrof een groep gezonde proefpersonen, zowel vrouwen als mannen.

Groep E: vrouwen.

- Kaukasisch ras
- leeftijd 18-35 jaar
- normale lever- en nierfuncties volgens de criteria van het CKCL-Dijkzigt
- anamnestiche geen gebruik van acetylsalicylzuur in de aan het onderzoek voorafgaande 2 weken
- geen gebruik van anticoagulantia
- geen belastende anamnese voor wat betreft thrombose of hemostase.

Deze groep werd onderverdeeld in:

- E₁ - vrouwen met een normale menstruele cyclus waarbij het onderzoek plaatsvond binnen 12 dagen na het begin van de menstruatie.
- E₂ - pilgebruiksters, vrouwen die gedurende tenminste zes maanden een oestrogeen-progestatief combinatiepreparaat gebruikten ter anticonceptie.

Groep F: mannen.

- Kaukasisch ras
- leeftijd 25-40 jaar
- normale lever- en nierfuncties volgens de criteria van het CKCL-Dijkzigt
- anamnestiche geen gebruik van acetylsalicylzuur in de aan het onderzoek voorafgaande 2 weken
- geen gebruik van anticoagulantia
- geen belastende anamnese voor wat betreft thrombose of hemostase.

Het was bij de selectie van patiënten en proefpersonen van groot belang om te weten of de te onderzoeken persoon in de 2 weken voorafgaand aan het onderzoek al dan niet acetosal had gebruikt. Aangezien in een groot aantal zg. huismiddelen acetosal blijkt te zijn verwerkt werd bij het opnemen van de anamnese een lijst gehanteerd van in Nederland verkrijgbare middelen die acetosal bevatten. Deze lijst, waaraan zijn toegevoegd een aantal veel gebruikte medicamenten die geen acetosal bevatten, is weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1. Preparaten die acetylsalicylzuur bevatten

Acenterine	Eco 3 tabl.
Acetosol F.N.A. tabl.	Econine tabl.
Acetosol comp. F.N.A. tabl.	Enterosarine dragees
Acetosol met fenacetine F.N.A. tabl.	Fenerodine tabl.
Alka-Seltzer	Fiorinal tabl.
Ambulin tabl.	Gelonida tabl.
Amerikaanse gele poeders	Grieppoeders extra sterk Daro
Amerikaanse pijnstillers tabl.	Grieppoeders Meenk
Apca tabl.	Heberine tabl.
Apernyl stiften	Hoofdpijn tabl. Meenk
A.P.C. tabl.	Hot Coldrex zakjes
A.P.C. comp. tabl.	Kiespijn-poeders Meenk
A.P.C. c. codeïne tabl.	Kiespijn tabl. Daro
A.P. tabl. (antineuralgicæ)	Kinder Aspro tabl.
A.P. codeïne tabl.	Lekasin tabl.
A.P.C.P.C. tabl.	Mac Lemon sachets
A.P.C. phenobarb. tabl.	Mann-preparaten: alleen de tabl.
Ascal poeder	Orphenisal tabl.
Asparetten tabl.	Perdolan tabl.
Aspirine tabl.	Rectoral hoofdpijn tabl.
Aspirine junior tabl.	Rectoral pijntabl.
Aspirine + C tabl.	Rheumin tabl.
Aspro tabl.	Rhodine tabl.
Buroletten tabl.	Rhonal tabl.
Buscoline tabl.	Robaxisal tabl.
Catalgix forte poeders	Sanapirin
Cephalin tabl.	Sinaspril tabl.
Chefarin 4 tabl.	Spasmo-Dolviran alleen de tabl.
Codeïne phosphas comp. tabl.	Togal tabl.
Coldrex tabl.	Vinkhuysen tabl.
Darosol tabl.	Dr. Wild's pijntabletten
Dispril bruistabl.	
Dolviran tabl. en zetpillen	
Drie-poeders	

Geen acetylsalicylzuur bevatten o.m.:

Finimal
Glifanan
Hedex
Sanalgin
Saridon
Witte Kruispoeders

HOOFDSTUK 5.

METHODIEK VAN HET EIGEN ONDERZOEK.

In hoofdstuk 3 werden argumenten aangevoerd voor de keuze van een aantal technieken, die bij ons onderzoek zijn gebruikt. In dit hoofdstuk zal de uitvoering van de door ons toegepaste methoden worden behandeld.

5.1. Uitvoering van de trombocytentelling.

Bij alle proefpersonen werd, naast de hierna te noemen specifieke onderzoek methoden, altijd een trombocytentelling in perifere veneus bloed uitgevoerd. Voor het opvangen van het bloed werd gebruik gemaakt van standaard plastic buisjes voorzien van Na₂-EDTA in gedroogde vorm. Alle trombocytentellingen werden uitgevoerd met een Coulter Thrombocounter in het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium van het AZR-Dijkzigt. De variatie coëfficiënt van trombocytentellingen in dit laboratorium is 4-5 % en ligt in dezelfde range als wordt opgegeven in de literatuur (Lindsay, 1975; Sejeny, 1975).

5.2. Uitvoering van de bepaling van de trombocyten aggregatie (ADP) in vitro met behulp van de aggregometer.

Het ADP-aggregatie onderzoek werd uitgevoerd in de afdeling Hematologie (Hoofd: Prof.Dr.J.Abels) van het AZR.-Dijkzigt. Alle bepalingen werden door één persoon uitgevoerd met een Payton aggregometer, roersnelheid 800 r.p.m.

Uitvoering van de ADP-aggregatie.

- vlotte venapunctie bij nuchtere proefpersoon in rugligging;
- bloed wordt opgevangen in 0.55 μ mol Na-citraat in de verhouding 49 : 1;

- bereiding van plaatjesrijk plasma (PRP) door centrifugeren gedurende 5 minuten bij 22° C met 185 x g; met behulp van plaatjesarm plasma (PPP) wordt het aantal thrombocyten op 200.000 per ml gebracht;
- toevoeging van ADP aan PRP tot de volgende eindconcentraties worden bereikt: 0.5, 1.0, 1.5 en 10.0 μmol ADP;
- ijking van de aggregometer, zodanig dat de cuvette met PPP 100 % transmissie aangeeft en de cuvette met PRP 0 % (zie figuur 3.1.).

Bepaalde parameters.

- spontane aggregatie, d.w.z. aggregatie zonder toevoeging van ADP. Spontane aggregatie is positief indien binnen 8 minuten tenminste 20 % aggregatie wordt bereikt. Dit percentage werd arbitrair aangenomen;
- stijgsnelheid, uitgedrukt in tangens α (figuur 3.3.);
- maximale aggregatie in procenten van de maximale transmissie (PPP = 100 %).

5.3. Uitvoering van de bepaling van de thrombocyten aggregatie "in vivo" met behulp van de Filtragometer.

Dit onderzoek werd verricht met een door Unilever Research Vlaardingen verstrekte Filtragometer (MK III), in combinatie met een Hewlett Packard 2-kanalige recorder. De dag vóór de meting werden de systemen (bestaande uit filter, mengkamer, aansluitstukken, spuit en driewegkranen) gemonteerd, gevuld met citraat en luchtbelvrij gemaakt. Alle metingen werden door één persoon uitgevoerd.

Bedrijfsklaar maken van de Filtragometer.

- silicóneren van alle onderdelen van het systeem;
- natriumcitraat 3.8 %, gefilterd door een microfilter, voor vulling van het systeem (figuur 3.4.);

- natriumcitraat 10.1 % voor infusie in het systeem (C) tijdens de test, eindconcentratie 3.8 %;
- heparine (Vitrum) 125 I.E./ml fysiologisch zout, voor infusie in het systeem (H) tijdens de test; eindconcentratie 5 I.E./ml.

Uitvoering van de filtragometrie.

- proefpersoon in rugligging;
- instellen van constante aanzuigsnelheid van 2 ml/min;
- lektest ter controle van het systeem op het aanzuigen van luchtballen;
- vlotte venapunctie (Luer naald, 18 G x 1½) en aansluiten op het systeem.

Bepaalde parameters.

- uit de curve worden berekend: de aggregatietijd tA (sec), de maximale aggregatie Amax (mmHg), de maximale desaggregatie Dmax (mmHg) en de tijden, benodigd voor het bereiken van, respectievelijk, de Amax en de Dmax (figuur 3.5);
- alle parameters worden op het registratiepapier in 0.5 mm nauwkeurig gemeten;
- voor statistische verwerking van de gegevens wordt een logaritmische transformatie toegepast, omdat empirisch is gebleken dat dit een normale verdeling oplevert.

5.4. Uitvoering van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal-methode.

Bij ons onderzoek werd gebruik gemaakt van de methode zoals beschreven door Stuart et al. (1975), die echter op een aantal punten enigszins werd gewijzigd.

Uitvoering van het onderzoek bij de proefpersoon.

- vlotte venapunctie, afnemen van 10 ml bloed in Na₂-EDTA ter bepaling van de uitgangswaarde van het MDA;

- toediening van 500 mg acetosal per os;
- dagelijks of om de andere dag afnemen van 10 ml Na₂-EDTA bloed via venapunctie, tot de uitgangswaarde van MDA is bereikt.

Uitvoering van de MDA-bepaling.

De afgenomen bloedmonsters werden altijd binnen 5-6 uur verwerkt. Om verlies van bloedplaatjes zoveel mogelijk te voorkomen werd steeds gebruik gemaakt van plastic materiaal of gesiliconeerd glaswerk.

De uitvoering van de bepaling is schematisch weergegeven in figuur 5.1. De verschillende stappen zullen waar nodig kort worden toegelicht.

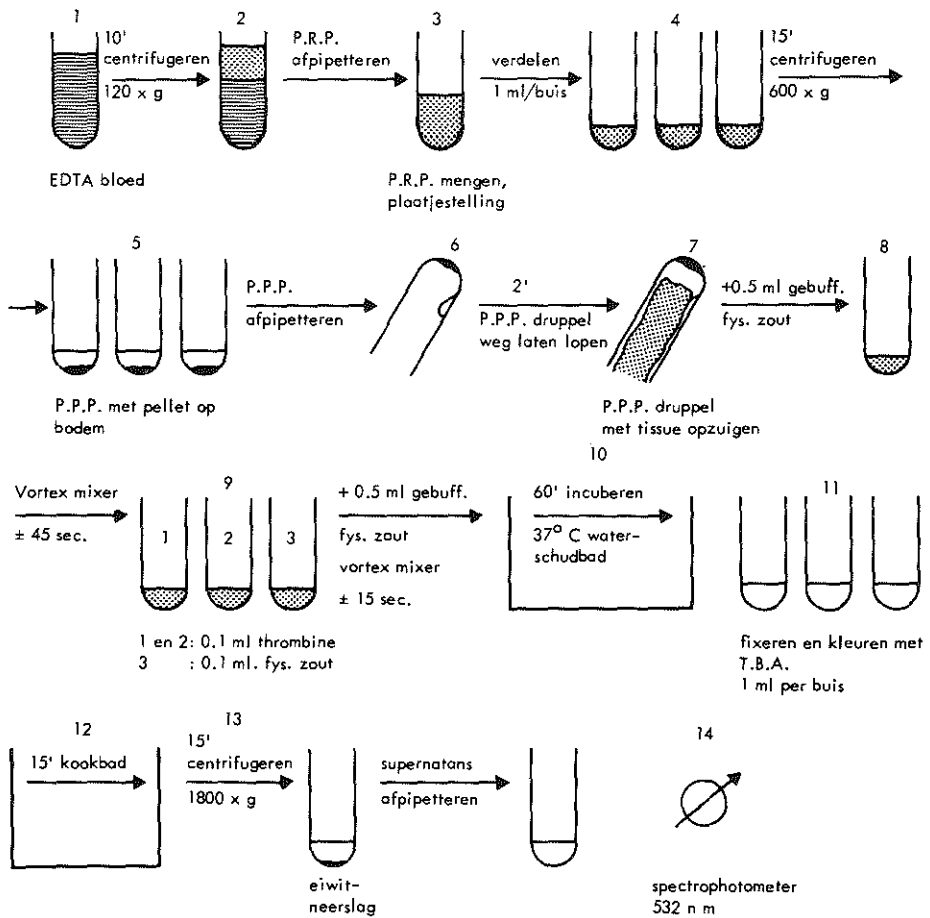
ad.1. Het door middel van venapunctie verkregen bloed wordt rechtstreeks in Na₂-EDTA opgevangen, in de verhouding 9 : 1. Door gebruik van Na₂-EDTA in een hoge concentratie (77 mmol/l) wordt aggregatie voorkomen, en bleek eveneens, dat de plaatjespellet altijd goed kan worden geresuspendeerd.

ad.2. Indien centrifugeren minder dan 3.5 ml PRP oplevert, wordt het overgebleven bloed opnieuw gemengd en afgedraaid onder dezelfde omstandigheden en het PRP aangevuld met relatief PPP, om toch het voor de bepaling noodzakelijke volume van 3.5 ml te verkrijgen.

ad.3. Alle thrombocytentellingen worden in duplo verricht in Isoton met een Coulter Counter model FN.

ad.5. Het verlies aan bloedplaatjes in het afgepipetteerde PPP is doorgaans minder dan 4 % van het aantal plaatjes in het PRP. In het zelden voorkomende geval dat het PPP een groter aantal plaatjes bevatte werd een correctie op de eindberekening van het MDA gehalte toegepast.

- ad.6-7. Op deze wijze wordt het laatste PPP verwijderd. Om uitdroging van de pellet te voorkomen dient hierna direct 0.5 ml gebufferd fysiologisch zout te worden toegevoegd. De door ons gebruikte buffer bevat geen Ca en Mg en wordt op de dag van gebruik verrijkt met glucose in een hoeveelheid van 2 mg/ml buffer.
- ad.8. De plaatjespellet wordt geresuspendeerd op de rand van een Vortex mixer, tot een homogene suspensie wordt verkregen.
- ad.9. Na aanvullen van het monster met gebufferde fysiologische zoutoplossing tot 1 ml wordt de vorming van MDA geïnduceerd met 0.1 ml thrombine, eindconcentratie 1.0 I.E./ml. De thrombine oplossing wordt dagelijks bereid en in het donker op ijs bewaard. De reactie wordt in duplo uitgevoerd en per patient wordt tenminste één suspensie als controle behandeld met 0.1 ml fysiologisch zout.
- ad.11. De vorming van MDA wordt geblokkeerd door toevoeging van 1 ml thiobarbituurzuur (TBA). De TBA-oplossing wordt dagelijks bereid zoals aangegeven door Placer et al. (1966). Hiervoor zijn twee stamoplossingen nodig. Eén oplossing bevat 0.8 % TBA in NaOH, geneutraliseerd met perchloorzuur; de tweede oplossing bestaat uit 7 % perchloorzuur. Deze laatste component fixeert de MDA reactie, terwijl het TBA in het kookbad de kleurreactie met het MDA geeft.
- ad.12-13. De gedenatureerde eiwitten worden door krachtig centrifugeren neergeslagen; hierdoor blijkt de vloeistof voldoende helder te worden om de extinctie bij 532 nm in een Zeiss spectrophotometer (type PMQ II/M4Q III) te kunnen meten.



Figuur 5.1. Schematische weergave van de MDA-bepaling in thrombocyten na reactie met thrombine en TBA.

Berekening van de hoeveelheid MDA per bloedplaatje.

De molaire absorptiecoëfficiënt van malondialdehyde na reactie met TBA bij gebruik van de eerder vermelde spectrophotometer is 1.48×10^5 . In het algemeen wordt de hoeveelheid TBA-positief materiaal uitgedrukt in nmol MDA/ 10^9 thrombocyten. Dit betekent in ons geval dat in de berekening moet worden verwerkt het volume van 2.1 ml van de testvloeistof en het aantal thrombocyten in het PRP. De berekening is dan als volgt:

$$\frac{\text{extinctie} \quad \times \quad \text{volume}}{N \text{ thromb./ml PRP} \times \text{mol.abs.coëf.}} =$$

$$\frac{\text{Ext.}}{N} \times \frac{2.1}{1.48 \times 10^5} = \frac{\text{Ext.}}{N} \times 1.42 \text{ nmol MDA}/10^9 \text{ thrombocyten.}$$

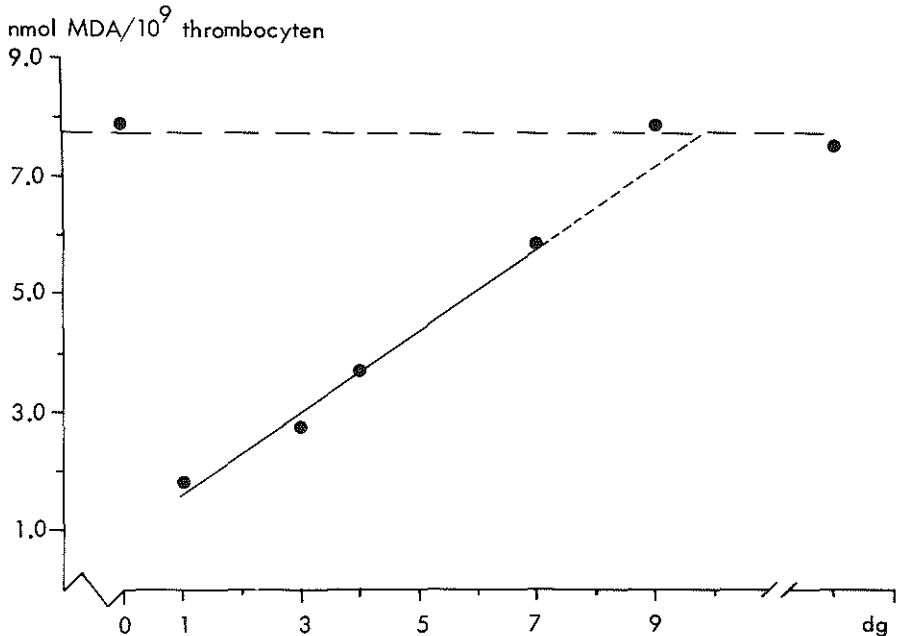
Bij elke proefpersoon werd de MDA-bepaling met thrombine tenminste 2 maal uitgevoerd en als gemiddelde waarde in de curve weergegeven. De controle met fysiologisch zout in plaats van thrombine levert eveneens een hoeveelheid TBA positief materiaal op. Dit komt overeen met de waarneming van Okuma (1971) dat thrombocyten ook zonder specifieke prikkel in staat zijn om MDA te vormen. De verkregen "fysiologisch zout" waarde werd door ons niet gebruikt om de MDA-bepaling te corrigeren, omdat vooralsnog niet duidelijk is door welke factoren deze waarde wordt beïnvloed.

Het uitzetten van de MDA-curve en bepaling van de levensduur van de thrombocyten.

De dagelijks of om de andere dag gemeten hoeveelheid MDA/ 10^9 bloedplaatjes wordt lineair tegen de tijd uitgezet. De best passende rechte wordt bepaald met de methode van de kleinste kwadraten. Het snijpunt van deze lijn met de basislijn, die evenwijdig aan de X-as wordt getrokken door de uitgangswaarde van het MDA, geeft het aantal dagen aan,

dat nodig is voor het verdwijnen van het acetosal-effect bij de thrombocytenpopulatie en komt overeen met de levensduur van de thrombocyten.

In figuur 5.2. is de MDA-lijn weergegeven van een gezonde proefpersoon. De punten zijn de gemiddelde MDA waarden; de s.e.m. van ieder punt is zo gering, dat deze binnen de stip valt.



Figuur 5.2. Voorbeeld van het verloop van de MDA concentratie na toediening van 500 mg acetosal op dag 0. Het snijpunt van de MDA-regressielijn met de basislijn (---) geeft in dit geval een thrombocyten levensduur van 10 dagen. De laatste MDA-bepaling werd verricht op de 12e dag.

Betrouwbaarheid van de methode.

De betrouwbaarheid van de methode is afhankelijk van vele factoren en kan niet worden aangegeven met één percentage, zoals Stuart en haar medewerkers (1975) hebben gedaan. De betrouwbaarheid zal ondermeer afhankelijk zijn van:

- 1 de zuiverheid en precisie van de bepaling van MDA;
- 2 de reproduceerbaarheid van de reactie van de thrombocyten om MDA te vormen;
- 3 de eventuele biologische variatie in de levensduur van thrombocyten binnen één proefpersoon;
- 4 de stabiliteit van de "steady state" situatie van aanmaak en verdwijning van thrombocyten binnen een proefpersoon.

Naar aanleiding van deze factoren werd het volgende onderzoek verricht.

ad.1. Bij drie proefpersonen werd de intra-assay variatie van de MDA-bepaling nagegaan. Uit elk monster werden 8 of 9 bepalingen verricht. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.1. De personen A en B hadden géén acetosal gebruikt, terwijl het monster van C werd afgenomen op de 3e dag na toediening van acetosal.

Tabel 5.1. Gegevens over de precisie van de MDA-bepaling in thrombocyten, na reactie met thrombine en TBA.

bepaling no.	n mol MDA/10 ⁹ thrombocyten		
	pat. A	pat. B	pat. C.
1	6.68	6.63	2.76
2	6.55	6.57	2.49
3	6.55	6.50	2.49
4	6.75	6.50	2.53
5	6.51	6.45	2.53
6	6.75	6.45	2.49
7	6.89	6.45	2.58
8	6.41	6.68	2.44
9	6.72		
\bar{X}	6.65	6.53	2.54
S.D.	0.15	0.09	0.10
variatie coëff.	2.3 %	1.4 %	3.9 %

Om een indruk te krijgen over de zuiverheid van de TBA bepaling zoals deze in dit hoofdstuk is beschreven, werden dagelijks van een standaard MDA oplossing, verkregen door oplossing van tetraethylacetaat in ethanol, vier mengsels van verschillende concentratie gemeten. De gegevens betreffende de samenstelling van de standaardmengsels en de precision van de opbrengst zijn vermeld in tabel 5.2.

Tabel 5.2. Gegevens over de nauwkeurigheid van de bepaling van vier standaard MDA concentraties door middel van de TBA-reactie.

standaardoplossing MDA nmol/ml	gevonden nmol/ml	S.D. nmol/ml	n
0.40	0.38	0.003	45
1.20	1.14	0.004	45
2.00	2.05	0.005	45
3.20	3.23	0.007	46

Ad.2. De uitgangswaarde is van groot belang voor de berekening van de levensduur, omdat door dit punt de basislijn evenwijdig aan de X-as wordt getrokken. In alle gevallen werd de betrouwbaarheid van deze waarde nagegaan door na afloop van de bepaling van de levensduur tenminste nog éénmaal een MDA-bepaling te verrichten. De waarde hiervan geeft de reproduceerbaarheid van de reactie van trombocyten om MDA te vormen weer en zou onder ideale omstandigheden gelijk moeten zijn aan de uitgangswaarde. Door ons werd een afwijking nog geaccepteerd wanneer deze een spreiding gaf van niet meer dan één dag. Uit het materiaal dat besproken zal worden in paragraaf 6.4. zijn om deze reden 4 waarnemingen weggelaten.

In figuur 5.2. is de thrombocyten levensduur opgegeven als 10 dagen waarbij is uitgegaan van de gemiddelde basislijn berekend uit drie waarden. Beschouwen we iedere waarde apart dan ziet men dat dit een spreiding oplevert van 9.5 - 10.5 dag.

In tabel 5.3. is de reproduceerbaarheid van de reactie van de thrombocyten om MDA te vormen opgenomen. Bij 13 proefpersonen zijn met elkaar vergeleken de 1e en 2e, en de 1e en 3e MDA waarde.

Tabel 5.3. Resultaten van de thrombocyten MDA-bepaling.

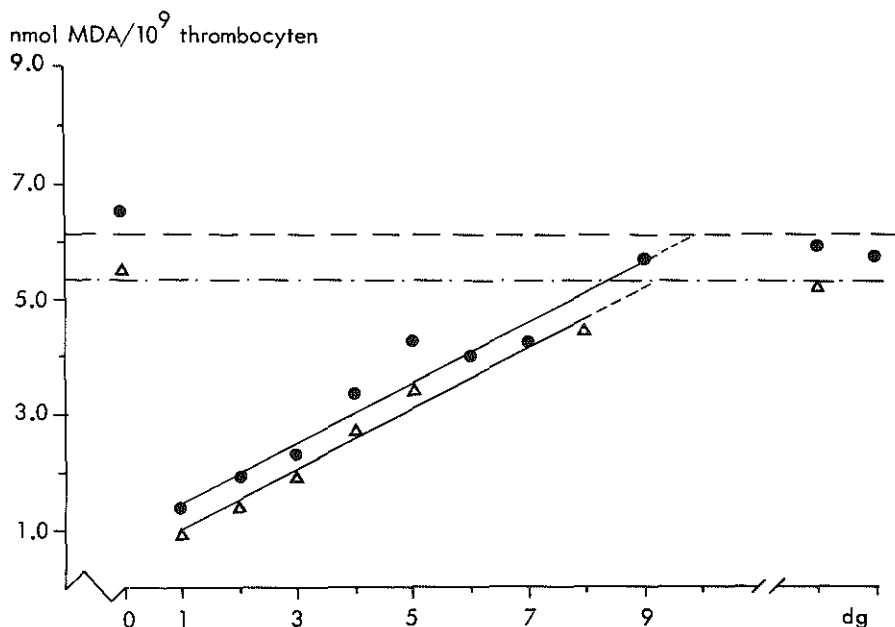
n mol MDA/10 ⁹ thrombocyten		
Δ 1e - 2e bepaling	Δ 1e - 3e bepaling	
13	13	n
0.61	0.43	$\bar{x} \Delta$
0.23	0.32	s Δ

Uit de tabel blijkt dat het gemiddelde verschil tussen de bepalingen gering is en bij de interpretatie van de basislijn in de normale range van 6-9 nmol/MDA 10⁹ thrombocyten een spreiding geeft die minder is dan 24 uur.

Moeilijkheden met de MDA-bepaling in de zin van een duidelijk verschillende opbrengst vóór toediening van acetosal en na afloop van de bepaling werden uitsluitend ondervonden bij zwangeren uit groep C (zie hoofdstuk 6.4.).

ad.3. Bij drie vrijwilligers is de bepaling van de thrombocyten levensduur volgens de acetosal-methode na 6-8 weken herhaald. In figuur 5.3. is dit grafisch weergegeven voor één van hen. De levensduur in dagen was bij allen de tweede keer gelijk aan die, welke de eerste keer werd

gevonden, terwijl de basislijn varieerde binnen de gestelde 24 uur.

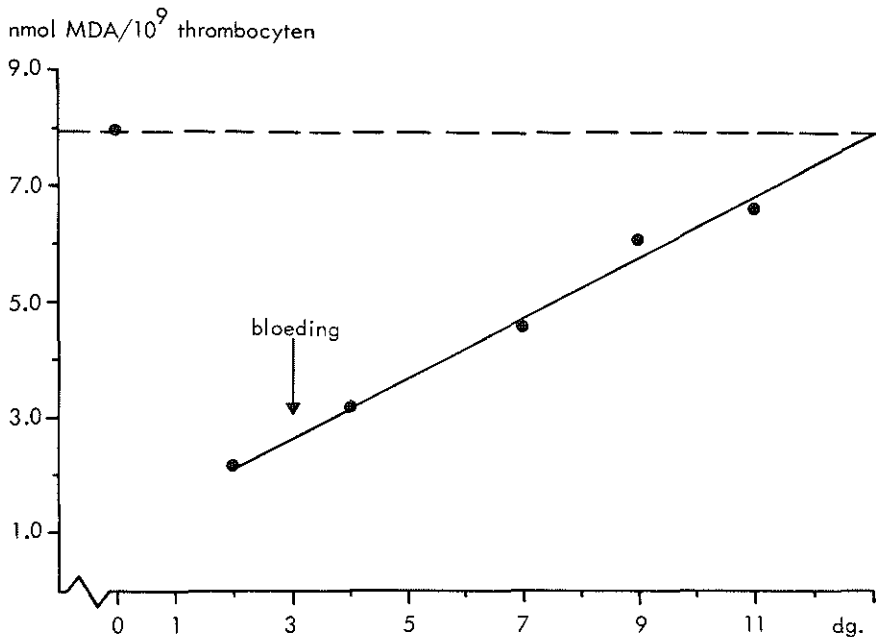


Figuur 5.3. Bepaling van de levensduur van thrombocyten (●) volgens de MDA-methode bij een proefpersoon; tweede bepaling (▲) na 8 weken. De laatste drie MDA-bepalingen werden verricht op respectievelijk de 13e (●,▲) en de 18e (●) dag na de toediening van 500 mg acetosal op dag 0.

Ad.4. De stabiliteit van de "steady state" situatie, van aanmaak en verdwijning van thrombocyten, bij een proefpersoon is van essentieel belang. Wij hebben de indruk dat veranderingen in de steady state niet tot uiting komen in de telling van het aantal thrombocyten in een perifeer bloedmonster.

Wij konden bij een drietal proefpersonen de thrombocyten acetosal levensduur bepalen, terwijl zij tijdens de bepaling bloedverlies hadden. Het betrof twee vrouwen met

een onttrekkingsbloeding en één gravida, die twee dagen na de enkelvoudige dosis acetosal beviel. In géén van de MDA-curven werd een afwijkende waarde waargenomen. Figuur 5.4. geeft het resultaat van de bepaling van de levensduur bij één van de proefpersonen die een oestrogeen-progestatief combinatiepreparaat gebruikte; de zwangere zal in het volgende hoofdstuk (6.4) nader worden besproken.



Figuur 5.4. Levensduur van thrombocyten bepaald volgens de MDA-methode bij een proefpersoon die op de 3e dag, na toediening van 500 mg acetosal op dag 0, een onttrekkingsbloeding had.

Uit het bovenstaande kan worden geconcludeerd dat de MDA-bepaling in thrombocyten een gevoelige en betrouwbare methode is. De hiermee verkregen goed reproduceerbare waarden maken het mogelijk om, door middel van het acetosal effect op bloedplaatjes, de thrombocyten levensduur te meten.

5.5. Uitvoering van het placentaonderzoek.

De placentas van alle onderzochte zwangeren werden, na inspectie en bepaling van het netto gewicht, gefixeerd en opgeslagen in gebufferde 4 % formaldehyde. Na een fixatie van tenminste 2 weken werd iedere placenta in coupes van ongeveer 1/2 cm dikte gesneden en macroscopisch onderzocht, zoals aangegeven door Wallenburg (1971). Microscopisch onderzoek van een coupe uit een centraal en een lateraal macroscopisch normaal gebied, alsook uit macroscopisch niet met zekerheid te identificeren lesies, vond plaats op de afdeling Pathologische Anatomie (Hoofd: Prof.Dr.G. Wielenga). Met name werd gelet op het voorkomen van infarcten en intervillieuze thrombi.

5.6. Overige hematologische en chemische bepalingen.

Als algemene controle op de conditie van de te onderzoeken proefpersonen werden in het CKCL-Dijkzigt bepaald:

Hb, hematocriet, fibrinogeen (volgens Claus), serum albumine, ureum, kreatinine, urinezuur, bilirubine, S.G.O.T. en S.G.P.T., cholesterol, vrij en esters.

HOOFDSTUK 6.

RESULTATEN EN BESPREKING VAN HET EIGEN ONDERZOEK.

Het onderzoek werd uitgevoerd in de periode van november 1975 tot oktober 1976. Bij het onderzoek waren in totaal 210 proefpersonen betrokken, die allen voldeden aan de in hoofdstuk 4 gestelde criteria. De uiteindelijke selectie werd bepaald door de laboratorium mogelijkheden. De combinaties van onderzoeksmethoden in de groepen proefpersonen zijn samengevat in tabel 6.1.

Tabel 6.1. De combinaties van methoden van onderzoek in de totale groep onderzochte proefpersonen.

	zwangeren			niet zwangere vrouwen			mannen
Filtragometer	+	+	-	+	-	-	-
ADP aggregatie	+	-	-	+	+	-	-
thrombocyten telling	+	+	+	+	+	+	+
placenta onderzoek	+	+	-	-	-	-	-
levensduur thrombocyten	-	-	+	-	-	+	+
totaal 210	47	105	30	10	4	9	5

Bij de weergave van de resultaten wordt gebruik gemaakt van de indeling in groepen zwangeren met ongestoorde dan wel gestoorde zwangerschap, of niet-zwangeren, zoals aangegeven in hoofdstuk 4. De zwangerschapsduur wordt steeds aangegeven als de klassewaarde over een periode van 2 weken; een zwangerschapsduur van 33 weken staat dus voor een periode van 32 1/7 tot en met 33 7/7 week.

Bij de statistische bewerking van de resultaten werden verschillende toetsen toegepast, die in de tekst worden vermeld. Van significantie wordt uitsluitend gesproken wanneer $P \leq 0.05$ (onbetrouwbaarheidsdrempel).

In de tabellen en de tekst zullen de statistische resultaten worden weergegeven met behulp van de volgende symbolen: \bar{X} = rekenkundig gemiddelde; s = standaard afwijking; n = aantal elementen in de steekproef; s.e.m. = standaardfout van het gemiddelde ($\frac{s}{\sqrt{n}}$).

6.1. Resultaten van de telling van het aantal thrombocyten.

Bij 10 niet-zwangere vrouwen en bij 146 zwangeren met een zwangerschapsduur variërend van 33-39 weken werd een thrombocytentelling uitgevoerd. In tabel 6.2. zijn de resultaten samengevat, gerangschikt volgens de groepen waarin de onderzochte personen werden ingedeeld en naar de zwangerschapsduur. Groep D omvatte slechts 5 zwangeren, die niet in de verdere beschouwing zijn opgenomen (voor het aantal thrombocyten van deze zwangeren zie tabel 6.7.).

Tabel 6.2. Het aantal thrombocyten in de onderzochte groepen verdeeld naar de duur van de amenorrhoe.

amenorrhoe (weken)	aantal thrombocyten x 10 ⁹ /l											
	groep A			groep B			groep C			groep E ₁		
	\bar{X}	s.e.m.	n	\bar{X}	s.e.m.	n	\bar{X}	s.e.m.	n	\bar{X}	s.e.m.	n
33	217	18	23	332	-	1	236	24	9	-	-	-
35	179	11	25	230	-	2	231	18	9	-	-	-
37	192	9	36	166	-	4	224	-	3	-	-	-
39	203	13	25	200	19	7	250	-	2	-	-	-
<u>Totaal</u>	197	6.2	109	204	16	14	234	11	23	238	19	10

De verdeling van het aantal onderzochte patiënten in groep A, zwangeren met een ongestoorde zwangerschap, is over de verschillende zwangerschapsweken vrijwel gelijk. Met behulp van regressie analyse (de Jonge, 1964, p. 560) is nagegaan of er een relatie bestaat tussen zwangerschapsduur en het aantal thrombocyten. Binnen de groep ongestoorde zwangerschappen blijkt géén significante relatie te kunnen worden aangetoond, zodat bij de vergelijking met de andere groepen geen onderscheid werd gemaakt tussen de verschillende duren van de zwangerschap.

Bij vergelijking van het gemiddelde aantal thrombocyten van de zwangeren met een ongestoorde zwangerschap (groep A) met dat van de niet-zwangeren (groep E₁) blijkt dat dit bij de zwangeren significant lager ligt (Student t-toets). Het aantal thrombocyten bij hypertensieve zwangeren (groep B) verschilt niet significant van dat in groep A (de telling vond plaats tijdens de hypertensieve fase van de zwangerschap); opmerkelijk zijn de resultaten in groep C, zwangeren waaruit kinderen met een te laag gewicht werden geboren: in deze groep is het aantal thrombocyten significant hoger dan bij de gezonde zwangeren uit groep A (Newman Keulstoets; de Jonge, 1964, p. 505). De relatie tussen het aantal thrombocyten en infarcering van de placenta binnen de verschillende groepen zal nader worden besproken in paragraaf 6.5.

Bespreking. De bevinding van een verminderd aantal thrombocyten in de normale zwangerschap in vergelijking met de niet-zwangere komt overeen met gegevens uit de literatuur (Shaper et al., 1968; van Royen, 1974). Het onderzoek van Sejeny et al. (1975), die eveneens gebruik maakte van de Coulter elektronische telmethode is in zoverre niet vergelijkbaar, dat deze auteur géén normaalwaarden opgeeft van niet-zwangere vrouwen. De door Sejeny aangetoonde significante progressieve daling van het aantal bloedplaatjes gedurende het verloop van de gehele zwangerschap, kon door ons in de laatste 8 weken van de zwangerschap niet worden bevestigd.

Algemeen wordt aangenomen dat pre-eclampsie (hypertensieve zwangerschap) een daling van het aantal thrombocyten ten gevolge heeft (McKay, 1974). De resultaten van ons onderzoek in groep B zijn hiermee echter niet in overeenstemming. Trudinger (1976) onderzocht het aantal thrombocyten bij verschillende groepen met pre-eclampsie en toonde aan dat bij uitsluitend bestaan van een essentiële hypertensie het aantal thrombocyten onveranderd blijft, terwijl er een significante daling optreedt in de groep met hypertensie én intra uteriene groeiretardatie. In onze groep hypertensieve zwangeren bevonden zich 2 zwangeren bij wie waarschijnlijk sprake was van essentiële hypertensie; ook bij deze 2 zwangeren verschilde het aantal thrombocyten niet van dat in groep A.

De door ons vastgestelde significante verhoging van het aantal thrombocyten in zwangerschappen, waaruit kinderen werden geboren met een te laag geboortegewicht, komt niet overeen met de bevindingen van Trudinger (1976) en Frigoletto et al. (1971); verdere mededelingen konden hierover in de literatuur niet worden gevonden. In ons materiaal is het gemiddelde aantal thrombocyten in deze groep gelijk aan dat buiten de zwangerschap. Het is niet mogelijk om min of meer exact aan te geven wanneer de placentainsufficiëntie, mogelijk ten gevolge van een thrombotisch proces in de uteroplacentaire arteriën, die kan hebben geleid tot de onvoldoende groei van de foetus, is ontstaan. In ieder geval waren er op het moment van de telling van de thrombocyten al duidelijke klinische aanwijzingen voor een achtergebleven foetale groei en was het proces dus toen al langere tijd -enkele weken- gaande. Vond de thrombocytentelling dus in groep B plaats tijdens een acuut proces (hypertensie), bij groep C is sprake van een al gedurende langere tijd bestaand chronisch pathologisch gebeuren.

6.2. Resultaten van de bepaling van thrombocyten aggregatie (ADP) met behulp van de aggregometer.

Dit onderzoek werd, in combinatie met de filtragometrie, uitgevoerd bij 61 personen. In tabel 6.3. zijn de resultaten samengevat, gerangschikt naar de verschillende groepen, bij een zwangerschapsduur van 33-39 weken. Zowel de grootte als de samenstelling van dit materiaal is een compromis tussen wat wenselijk is en wat praktisch mogelijk was; ten gevolge hiervan heeft de statistische bewerking (regressie- en variantie analyse; de Jonge, 1964, p. 723) een benaderend karakter.

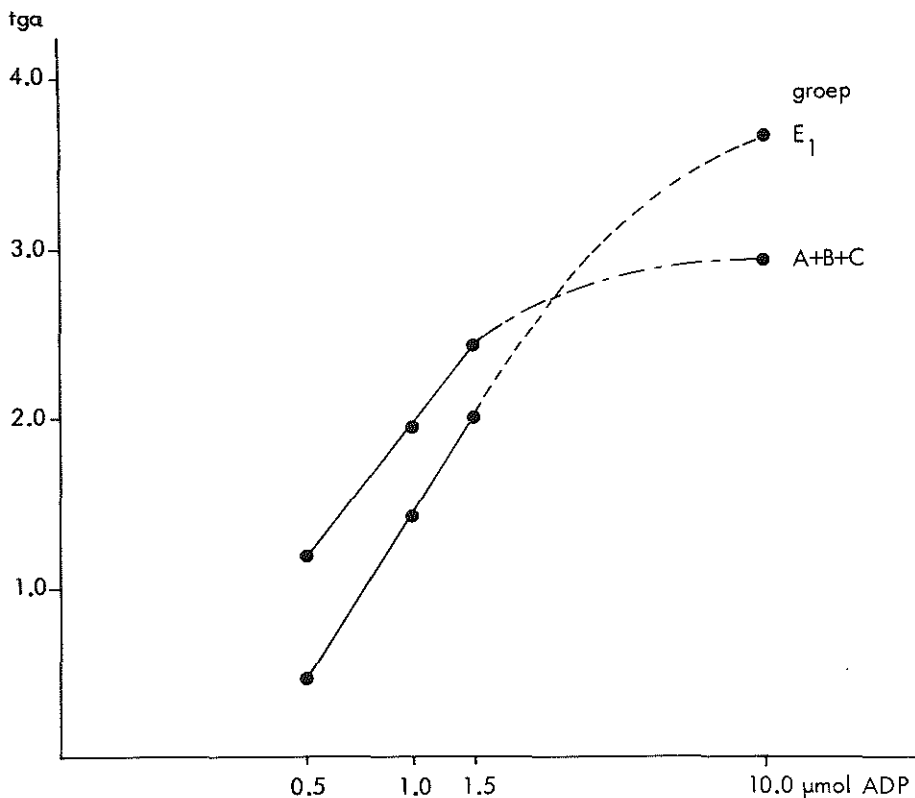
Bij de beoordeling van het materiaal is ervan uitgegaan dat, bij de door ons gebruikte methode met oplopende ADP eindconcentraties, altijd bij één proefpersoon een toeneming of een gelijkblijven van de stijgsnelheid en de maximale aggregatie moet worden gevonden. Arbitrair is aangenomen dat bij een daling van > 0.30 voor de tangens α en $> 5\%$ voor de maximale aggregatie ten opzichte van de vorige uitkomst, de bepaling fout was. Deze situatie deed zich voor bij 3 proefpersonen voor wat betreft de tangens α en bij 1 proefpersoon voor wat betreft de maximale aggregatie. Bij analyse van de *stijgsnelheid* van de ADP aggregatiecurve blijkt reeds bij oppervlakkige beschouwing en ook bij statistische toetsing, dat er tussen de groepen A, B en C onderling géén verschil bestaat in de gemiddelde tangens α . Vergelijken we echter de totale groep zwangeren (A+B+C) met de niet-zwangere groep E_1 , dan blijkt er wel een duidelijk verschil te bestaan in het verloop van de aggregatie (figuur 6.1.).

Bij toepassing van de bovengenoemde benaderende regressie- en variantie analyse op deze curven blijkt:

- a De curve van de zwangeren gaat bij een lagere dosis ADP stijgen; dit verschil is significant bij $0.5 \mu\text{mol ADP}$.
- b De curve van zwangeren verloopt minder steil.
- c De curve van de zwangeren eindigt bij de hoogste ADP concentratie significant lager dan de curve van de niet-zwangeren.

Tabel 6.3. Resultaten van de ADP-aggregatie in de onderzochte groepen.

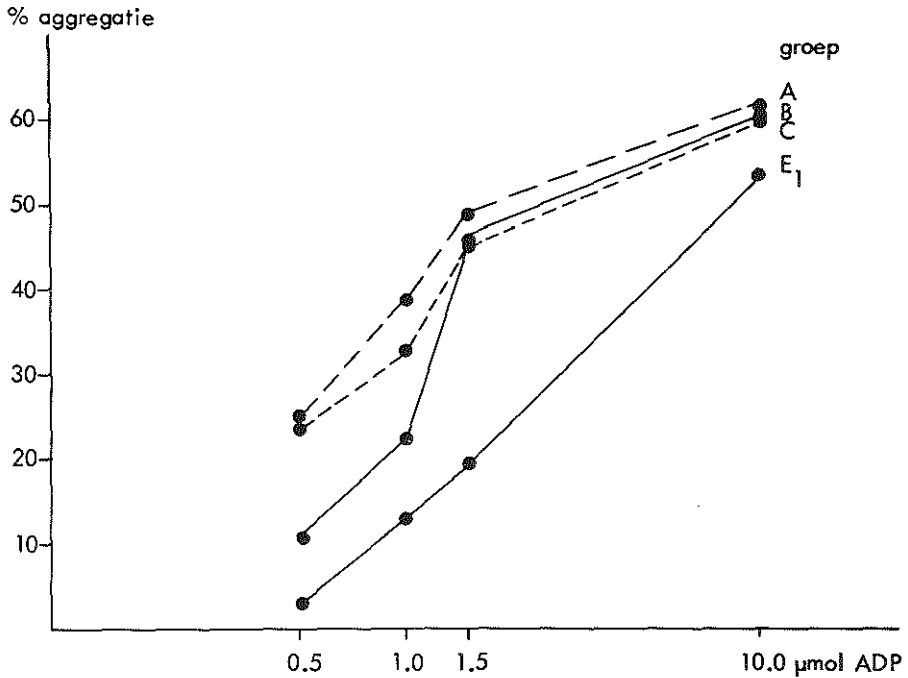
bepaalde parameters	groep A				groep B				groep C				groep E ₁				
	eindconcentratie ADP (µmol)																
	0.5	1.0	1.5	10.0	0.5	1.0	1.5	10.0	0.5	1.0	1.5	10.0	0.5	1.0	1.5	10.0	
tgα \bar{X}	1.17	2.12	2.43	2.98	1.12	1.70	2.20	2.74	1.16	1.89	2.26	2.72	.39	1.31	2.03	3.66	
s.e.m.	.09	.11	.08	.12	.13	.18	.19	.14	.16	.14	.11	.14	.10	.20	.18	.24	
n	27	27	27	27	6	6	6	6	11	11	11	11	14	14	14	14	
max \bar{X}	24.9	38.0	48.7	61.3	11.7	22.6	46.1	60.9	23.9	32.5	45.2	60.0	3.4	12.9	19.2	53.6	
s.e.m.	3.4	2.9	3.1	1.6	2.0	3.7	6.0	5.6	5.6	4.7	3.8	2.6	1.0	4.3	4.6	4.5	
n	26	26	26	26	7	7	7	7	13	13	13	13	14	14	14	14	
spontane aggregatie	n	5				0				4				0			



Figuur 6.1. De stijgsnelheid van de aggregatiecurve (tg α) in de totale groep zwangeren (A+B+C, n=44) en in de groep niet-zwangeren (E₁, n=14) uitgezet tegen de logaritme van de eindconcentratie ADP.

De *maximale aggregaties* in de verschillende groepen kunnen eveneens grafisch worden weergegeven (figuur 6.2.). Bij benaderende regressie- en variantie analyse van de curven blijkt dan dat:

- a De curve van groep E₁ geen significante afwijking vertoont van de rechtlijnigheid, terwijl de curves van groep A, B en C significant kromlijinig zijn.



Figuur 6.2. De maximale aggregatie in de verschillende groepen zwangeren (A, n=26; B, n=7; C, n=13) en in de groep niet-zwangeren (E₁, n=14) uitgezet tegen de logaritme van de eindconcentratie ADP.

- b De lineaire helling van groep B en E₁ significant steiler is dan die van de groepen A en C. Onderling verschillen de hellingen in de groepen B en E₁, respectievelijk A en C niet significant van elkaar.
- c De maximale aggregatie in groep E₁ significant lager ligt dan die van de overige groepen. Tussen de groepen A en C is géén significant verschil in hoogte van de maximale aggregatie aantoonbaar. Over groep B, de hypertensieve zwangeren, kan geen algemene uitspraak worden gedaan, omdat de helling hier significant verschillend is van die in groep A en C.

Tenslotte is in tabel 6.3. de frequentie weergegeven van *spontane aggregatie*, zoals deze bij de verschillende groepen is waargenomen. De maximale aggregatie die hierbij werd bereikt varieerde van 20 - 70 %. Spontane aggregatie werd nimmer waargenomen in de controlegroep E₁ en groep B, terwijl groep A en C een score bereiken van respectievelijk 5 (14 %) en 4 (26 %).

Bespreking. Uit de resultaten van het onderzoek naar de ADP-aggregatie in vitro blijkt dat thrombocyten bij zwangeren met zowel een normale als een gestoorde zwangerschap een ten opzichte van niet-zwangeren verhoogde neiging tot aggregatie vertonen. Dit komt tot uiting in een sneller bereiken van een hogere maximale aggregatie bij lagere concentraties ADP. Deze waarneming wordt gesteund door het vinden van spontane aggregatie in de groep zwangeren, wat bij niet-zwangeren in het geheel niet werd waargenomen. Tussen de zwangeren met een normale en die met een door hypertensie of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap konden in dit materiaal geen verschillen in ADP aggregatie worden aangetoond.

Vergelijking van onze resultaten met die, welke zijn opgegeven in de literatuur is vrijwel onmogelijk wegens de variaties in de gevolgde methode. Zo toont van Royen (1974) géén significant verschil aan in de maximale aggregatie en tangens α tussen normale zwangeren in het 3e trimester en een controlegroep niet-zwangere vrouwen. De door hem gebruikte methode wijkt echter af van de eerder genoemde standaard condities (hoofdstuk 3.3.1), met name voor wat betreft de lage roersnelheid van de plaatjessuspensie (300 r.p.m.) en het grotere volume waarin de bepaling wordt uitgevoerd, terwijl het aantal thrombocyten in het PRP niet wordt opgegeven. Kunz et al. (1975) komen, zonder vermelding van de standaardcondities van de door hem gebruikte methode, eveneens tot de conclusie, dat

er geen verschil is in de maximale aggregatie bij verschillende ADP concentraties tussen niet-zwangeren en zwangeren met een ongestoorde graviditeit. Kunz en medewerkers onderzochten eveneens een groot aantal (67) hypertensieve zwangeren en vonden dat de maximale aggregatie van deze groep niet significant verschillend was van die van de twee vorige groepen. Zij toonden wel een significante toeneming aan van de stijgsnelheid van de ADP aggregatie curve bij hypertensieve zwangeren. De resultaten van deze onderzoekers zijn slechts ten dele met die van ons vergelijkbaar, omdat de eindconcentraties ADP (2 en 4 μmol) afwijken en er geen mededeling wordt gedaan over het gewicht van het kind, zodat geen vergelijking kan worden gemaakt met de door ons onderzochte groep zwangeren met een kind met een te laag geboortegewicht.

6.3. Resultaten van de bepaling van thrombocyten aggregatie met behulp van de Filtragometer.

De bepaling van de thrombocytenaggregatie "in vivo" volgens de directe methode met de Filtragometer werd in totaal bij 162 personen uitgevoerd. In tabel 6.4. zijn de resultaten van 109 onderzochte zwangeren in groep A samengevat. Hierbij moet worden opgemerkt dat niet bij iedere Filtragometer bepaling alle parameters konden worden gemeten: in 16 gevallen werd geen meetbare maximale aggregatie verkregen. Dit zou kunnen betekenen dat, na infusie van citraat, de aggregatie doorgaat, het filter vrijwel geblokkeerd wordt en het drukverschil (ΔP) snel oploopt. Bij één meting werd geen desaggregatie verkregen, waardoor een evenwichtssituatie op het filter optreedt met een gedeeltelijk door irreversibele aggregaten afgesloten filter. Bij toepassing van regressie-analyse op deze resultaten blijkt er geen significante invloed van de zwangerschapsduur op 4 van de 5 Filtragometer parameters aantoonbaar te zijn; de $\log t_{\text{Dmax}}$ vertoont een dalende tendens met het toenemen van de duur van de amenorrhoe ($P_2 = 0.052$). Dit

Tabel 6.4. Resultaten van de filtragometrie in groep A.

bepaalde parameters		amenorrhoe (weken)				totaal
		33	35	37	39	
log tA (sec)	\bar{X}	1.92	1.94	1.91	1.93	1.92
	s.e.m.	0.031	0.036	0.043	0.037	0.019
	n	23	25	36	25	109
log Amax (mm Hg)	\bar{X}	1.24	1.13	1.27	1.24	1.22
	s.e.m.	0.081	0.071	0.076	0.095	0.040
	n	21	21	32	19	93
log tAmax (sec)	\bar{X}	1.41	1.42	1.36	1.41	1.39
	s.e.m.	0.036	0.042	0.034	0.047	0.020
	n	21	21	32	19	93
log Dmax (mm Hg)	\bar{X}	1.05	0.93	1.09	1.03	1.03
	s.e.m.	0.098	0.108	0.095	0.137	0.054
	n	21	20	32	19	92
log tDmax (sec)	\bar{X}	1.51	1.44	1.33	1.35	1.40
	s.e.m.	0.053	0.080	0.053	0.087	0.034
	n	21	20	32	19	92

betekent dus dat de tijd, nodig voor maximale desaggregatie, aan het einde van de zwangerschap verkort zou zijn. Op grond van deze resultaten zijn bij de hierna volgende analyse van de andere groepen alle zwangerschapsduren, variërend van 33-39 weken, samengenomen.

In tabel 6.5. zijn de resultaten van de filtragometrie in de verschillende groepen, behalve groep D, samengevat. De 5 patiënten uit groep D zullen apart worden besproken. Bij statistische toetsing (Student t-toets) blijkt, dat er tussen groep A en groep E₁ geen significante verschillen in de filtragometer parameters kunnen worden aangetoond. Dit is evenmin het geval bij vergelijking van de groepen A, B en C onderling (Newman Keuls toets). Wel vertoont zowel de maximale aggregatie (Amax) als de maximale desaggregatie (Dmax) een tendens om in de zwangerschap hoger uit te vallen dan bij de niet-zwangeren. Wanneer wij de Amax voor alle groepen zwangeren samennemen en vergelijken met die bij de niet-zwangeren nadert het verschil de overeengekomen onbetrouwbaarheidsdrempel (Student t-toets,

Tabel 6.5. Resultaten van de filtragometrie in de onderzochte groepen.

bepaalde parameters		groep A	groep B	groep C	groep E ₁
log tA	\bar{X}	1.92	1.89	1.89	1.90
(sec)	s.e.m.	0.019	0.035	0.029	0.034
	n	109	14	24	10
log Amax	\bar{X}	1.22	1.32	1.22	0.98
(mm Hg)	s.e.m.	0.040	0.110	0.072	0.083
	n	93	11	18	8
log tAmax	\bar{X}	1.39	1.39	1.37	1.31
(sec)	s.e.m.	0.020	0.055	0.051	0.036
	n	93	11	18	8
log Dmax	\bar{X}	1.03	1.05	1.12	0.76
(mm Hg)	s.e.m.	0.054	0.096	0.085	0.106
	n	92	11	18	7
log tDmax	\bar{X}	1.40	1.58	1.37	1.54
(sec)	s.e.m.	0.034	0.065	0.095	0.086
	n	92	11	18	7

$P_2 = 0.067$).

Tijdens de filtragometrie bepaling werden tevens de in hoofdstuk 5.6. genoemde hematologische en chemische bepalingen verricht. Volgens de normale correlatierekening (de Jonge, 1964, p. 604) werden in géén van de groepen significante correlaties gevonden tussen de Filtragometer parameters en het aantal thrombocyten, het fibrinogeen-gehalte, het serum albumine en het serum cholesterol. Groep D, zwangeren met hypertensie én onderontwikkeling van de foetus, bevatte een te gering aantal patiënten om de waarnemingen statistisch te verwerken. De resultaten zijn weergegeven in tabel 6.6. In tabel 6.7. zijn de meest relevante klinische gegevens over deze patiënten opgenomen. Uit de resultaten van de filtragometrie in groep D komen geen duidelijk verschillen met de ongestoorde zwangerschap naar voren.

Tenslotte werd nog nagegaan of placenta infarcering van invloed zou kunnen zijn op de filtragometrie parameters, door binnen de groepen A en C een onderverdeling te maken

Tabel 6.6. Resultaten van de filtragometrie in groep A en bij de 5 zwangeren van groep D.

	log tA (sec)	log Amax (mm Hg)	log tAmax (sec)	log Dmax (mm Hg)	log tDmax (sec)
groep A					
\bar{X}	1.92	1.22	1.39	1.03	1.40
s.e.m.	0.019	0.040	0.020	0.054	0.034
n	109	93	93	92	92
groep D					
patient no					
1	1.86	1.94	1.87	-	-
2	1.74	1.88	1.54	1.87	1.08
3	1.81	1.11	1.28	0.95	1.46
4	1.98	0.87	1.16	0.66	1.57
5	1.91	1.13	1.54	1.06	1.31
\bar{X}	1.86	1.39	1.48	1.14	1.35
s.e.m.	0.041	0.218	0.123	0.258	0.106
n	5	5	5	4	4

Tabel 6.7. Klinische gegevens betreffende de 5 zwangeren uit groep D waarbij filtragometrie werd verricht (zie tabel 6.6.).

patient no.	syst/diast bloeddruk	amenorrhoe (wk)	thromb. $\times 10^9/1$	kind gesl/gew	Apgar score 1' - 5'	placenta infarcering
1	165-110	32	226	♀ 1790	8-10	+
2	140-100	34	183	♂ 2490	7-9	+
3	160-100	36	256	♂ 2270	9-10	5%
4	165-110	34	171	♀ 980	durante partu †	5-10%
5	160-100	32	207	♂ 2590	8-10	-

tussen het wel of niet voorkomen van placenta infarcten. Hierbij konden geen significante verschillen worden aangetoond.

Bespreking. Uit de resultaten van de filtragometrie komt naar voren dat de zwangere, in vergelijking tot de niet-zwangere, mogelijk een verhoogde neiging vertoont tot het vormen van plaatjesaggregaten. De verschillen zijn echter niet significant, hoewel het verschil in de Amax de onbetrouwbaarheidsdrempel van 5 % benadert. Onder verwijzing naar hoofdstuk 3.3.2. kan worden verondersteld dat de toegenomen Amax verband houdt met vermeerdering van het aantal spontane aggregaten. De bij de zwangere -hoewel niet significant- verhoogde Dmax zou kunnen wijzen op het ontstaan van meer stabiele aggregaten dan buiten de zwangerschap. In de gestoorde en de ongestoorde zwangerschap verschillende de aggregatieparameters niet van elkaar.

6.4. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal-methode.

De levensduur van de thrombocyten werd bepaald bij 30 zwangeren, waarvan 17 uit groep A, 9 uit groep C en 4 uit groep D. Tevens werd de bepaling uitgevoerd bij 9 niet-zwangere vrouwen (groep E₁ en E₂) en bij 5 mannen.

In tabel 6.8. zijn de resultaten opgenomen van de bepaling van de levensduur van de thrombocyten in de groep niet-zwangere vrouwen. Alle vrouwen in groep E₂ gebruikten een oestrogeen-progestatief combinatiepreparaat ter anticonceptie. Alle gebruikte preparaten bevatten 0.05 mg ethinyl-estradiol en werden ten tijde van het onderzoek reeds gedurende tenminste 3 maanden gebruikt.

Uit deze tabel blijkt dat de gemiddelde MDA opbrengst per 10⁹ bloedplaatjes, berekend uit de waarde vóór het gebruik van acetosal en de controle bepaling na afloop van de levensduur, niet gelijk is voor verschillende onderzochte proefpersonen. Dit betekent dat de MDA basislijn, die

wordt gebruikt voor berekening van de levensduur, bij verschillende individuen op een verschillend niveau ligt. Het aantal thrombocyten werd bepaald uit veneus bloed, voordat de proefpersoon acetosal had ingenomen. Tijdens de bepaling van de thrombocyten levensduur werden de thrombocyten nog tweemaal geteld waarbij geen veranderingen van het aantal werden gevonden.

Tabel 6.8. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal methode bij 9 niet-zwangere vrouwelijke proefpersonen.

groep	proefpersoon no	leeftijd	thrombocyten levensduur (dg)	aantal thrombocyten $\times 10^9/l$	gemiddelde MDA $nmol/10^9$ thrombocyten
E ₁ (geen pil)	1	34	10	225	4.26
	2	34	9	229	5.66
	3	32	9	249	4.96
E ₂ (pil)	4	28	13	225	7.95
	5	22	10	252	6.00
	6	20	10	216	6.55
	7	29	10	171	5.72
	8	23	8	231	5.31
	9	29	8.5	293	5.13
range		20-34	8-13	171-293	4.26-7.95
\bar{X}		28	9.7	232	5.73
s.e.m.			0.48	11	0.35

Acetosal blijkt dus geen meetbare invloed uit te oefenen op het aantal circulerende thrombocyten, dat een weerspiegeling is van de steady state situatie. Een verstoring van de steady state ten gevolge van een uteriene bloeding kon evenmin worden aangetoond (zie hoofdstuk 5.4.).

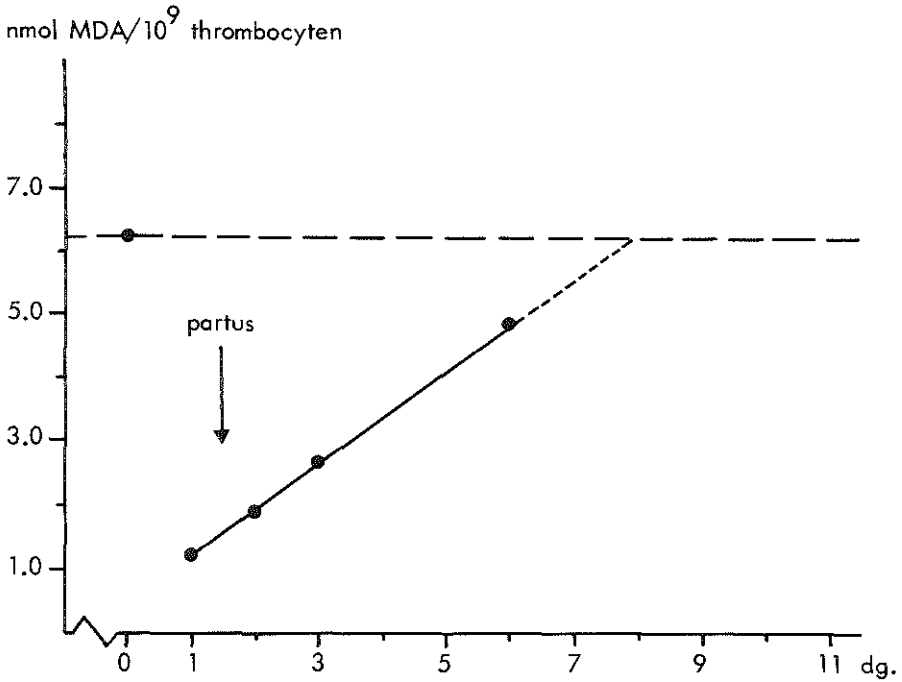
Er blijkt in dit materiaal geen verschil te bestaan tussen de levensduur van thrombocyten in groep E₁ en groep E₂. Vergelijken wij de resultaten van de totale groep niet-zwangeren met die van de groep vrouwen met een ongestoorde

zwangerschap (tabel 6.9.), dan blijkt dat de thrombocyten levensduur van beide groepen niet significant verschillend is (Student t-toets).

Ook hier blijkt dat het aantal thrombocyten in de zwangerschap gemiddeld lager ligt dan bij de niet-zwangere (vergelijk hoofdstuk 6.1.).

Tabel 6.9. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal methode bij 17 normale zwangeren (groep A).

proefpersoon no.	leeftijd (jr)	amenorrhoe (wk)	thrombocyten levensduur (dg)	aantal thrombocyten $\times 10^9/l$
1	25	36	9.5	224
2	21	31	9	292
3	25	33	11.5	240
4	33	36	9.5	220
5	26	34	7.5	222
6	23	31	8	190
7	35	36	8	162
8	24	39	10.5	206
9	25	33	10	135
10	27	36	10	185
11	20	38	8	181
12	26	33	8	193
13	27	33	8	227
14	28	36	9	262
15	20	36	10	208
16	26	32	11.5	193
17	24	31	8.5	187
range	20-35		7.5-11.5	135-292
\bar{X}	26		9.2	207
s.e.m.	-		0.30	9



Figuur 6.3. Bepaling van de thrombocyten levensduur bij een zwangere die tijdens de bepaling beviel. De MDA waarden liggen op een rechte lijn.

Het aantal patiënten in groep D is te gering voor statistische bewerking. In tabel 6.11 zijn enkele relevante gegevens samengevat. Hieruit blijkt dat het aantal thrombocyten ($\bar{X} = 126$) lager is dan in groep A ($\bar{X} = 207$), terwijl de levensduur van de thrombocyten in 2 van de 4 gevallen korter is dan 8 dagen.

Uitsluitend in deze groep zwangeren werden moeilijkheden ondervonden bij de bepaling van de thrombocyten levensduur. Dit werd veroorzaakt doordat de MDA opbrengst per 10^9 thrombocyten vóór het geven van acetosal en na afloop van de bepaling vaak zeer verschillend bleek te zijn.

Tabel 6.11. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal methode bij 4 zwangeren met hypertensie en kinderen met een te laag geboortegewicht.

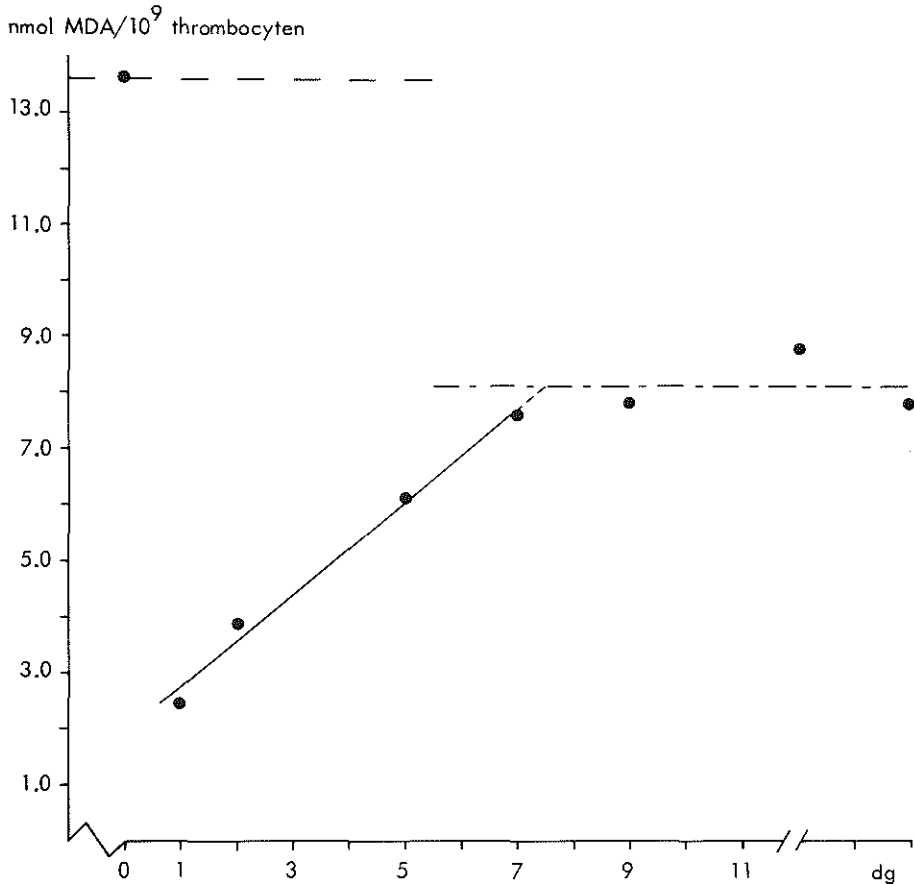
proefpersoon no.	leeftijd (jr)	amenorrhoe (wk)	thrombocyten levensduur (dg)	thrombocyten aantal $\times 10^9/1$	opmerkingen
1	26	32	9	124	essentiele hypertensie
2	27	34	7.5	103	acute hypertensie
3	31	36	7	129	wisselend hypertensief
4	25	34	10	148	acute hypertensie

In het geval van patiënte 2 uit tabel 6.11. wordt duidelijk geïllustreerd welke verschillen in de MDA opbrengst kunnen optreden.

Deze 27-jarige gravida werd opgenomen in de 34e week van haar eerste zwangerschap wegens snel toegenomen hypertensie, 160/100 mm Hg maximaal, oedeem en proteinurie. Het laboratoriumonderzoek leverde onder andere op: Hb. 8.0 mmol/l, Ht 0.39, thrombocyten $103 \cdot 10^9/1$, urinezuur 0.40 $\mu\text{mol}/1$ en een laag-normaal totaal serum eiwit gehalte van 62 g/l. Er was sprake van een negatieve discongruentie, géén weeënactiviteit, regulaire foetale harttonen en een normaal uitwendig cardiotokogram. Tijdens de klinische observatieperiode, waarbij patiënte uitsluitend diazepam kreeg, werd begonnen met de bepaling van de thrombocyten levensduur. De resultaten zijn weergegeven in figuur 6.4. Hieruit blijkt dat de MDA opbrengst vóórdat acetosal was toegediend $13.6 \text{ nmoL}/10^9$ bloedplaatjes bedroeg. Deze waarde werd bij herhaling na afloop van de bepaling niet teruggevonden. Vrijwel onmiddellijk na het begin van de bepaling daalde de bloeddruk tot 125/85 mm Hg en verdwenen ook het oedeem en de proteinurie. Op de 14e dag na het innemen van de acetosal was het thrombocytenaantal gestegen tot $138 \times 10^9/1$. De thrombocyten levensduur werd in dit geval berekend door de basis-

lijn te trekken door het gemiddelde van de drie laatste meetpunten (8.15 nmol MDA/10⁹ bloedplaatjes) en was verkort tot 7.5 dag. De hoge uitgangswaarde van het MDA werd hier buiten beschouwing gelaten.

Veertien dagen na het begin van de bepaling beviel patiënte van een dochter van 2390 gram (5 - 10e percentiel). De placenta woog 560 gram en bevatte een enkel infarct.



Figuur 6.4. Bepaling van de thrombocyten levensduur bij een zwangere met acute hypertensie. De hoge uitgangswaarde MDA kon na dien niet meer worden aangetoond. De laatste twee MDA bepalingen die betrekking hebben op de gemiddelde basislijn (-.-.-) werden verricht op de 12e en 14e dag na toediening van 500 mg acetosal op dag 0.

Een mogelijk verklaring zou kunnen zijn, dat er tijdens de hypertensieve fase een verandering is opgetreden in de thrombocyten populatie, in de zin van het in circulatie komen van meer jonge thrombocyten. Volgens Okuma (1969) zouden jonge thrombocyten meer MDA vormen dan oude. Tenslotte zijn in tabel 6.12 de resultaten opgenomen van de bepaling van de thrombocyten levensduur bij enkele gezonde mannelijke vrijwilligers. Bij 3 van hen werd na 6-8 weken een tweede bepaling uitgevoerd (zie hoofdstuk 5.4). Het blijkt, dat de levensduur van de thrombocyten in deze groep niet afwijkt van die van de groep niet-zwangere vrouwen.

Tabel 6.12. Resultaten van de bepaling van de levensduur van thrombocyten volgens de acetosal methode bij 5 mannen. Bij 3 van hen werd de bepaling na 6-8 weken herhaald.

proefpersoon no.	leeftijd (jr)	thrombocyten levensduur (dg)	2e thrombocyten levensduur (dg)	aantal thrombocyten $\times 10^9/l$
1	36	9.5	9.5	267
2	33	9	10	189
3	32	8.5		244
4	32	9	10	204
5	36	10		208
range	32-36	8.5-10		189-267
\bar{x}	34	9.2		222
s.e.m.	-	0.25		14

Bespreking. De bij mannen en niet-zwangere vrouwen met behulp van de acetosal-methode gevonden levensduur van thrombocyten van 8 tot 13 dagen komt overeen met die, welke in de literatuur wordt vermeld als resultaat van bepaling van de overleving van ^{51}Cr thrombocyten. De

levensduur van thrombocyten in de ongestoorde zwangerschap wijkt niet af van die bij de niet-zwangere. Daarentegen wordt bij zwangeren met kinderen met een te laag uiteinde-lijk geboortegewicht een significante verkorting gevonden. De levensduur van thrombocyten bij zwangeren met hypertensie en te geringe foetale groei kan in ons kleine materiaal niet betrouwbaar worden geevalueerd. In 2 van de 4 gevallen was de levensduur korter dan 8 dagen. Hierbij moet wel worden opgemerkt, dat de bepaling bij deze groep zwangeren moeilijkheden opleverde wegens de wisselende MDA opbrengst tijdens de hypertensieve fase. In tegenstelling hiermee bleek de MDA waarde niet te worden beïnvloed door bloed-verlies durante partu of door een onttrekkingsbloeding.

6.5. Resultaten van het placenta onderzoek.

Ten gevolge van een aantal organisatorische problemen werden de placentas van de zwangeren, bij wie de levensduur van de thrombocyten werd bepaald niet volgens de in hoofdstuk 5.5. aangegeven standaardprocedure onderzocht. Het volgende heeft dus uitsluitend betrekking op de zwangeren bij wie filtragometrie en ADP-aggregatie werd uitgevoerd. Van de 152 zwangeren bij wie dit onderzoek werd verricht zijn 13 placentas (8 %), voornamelijk uit de groep van de ongestoorde zwangerschap, verloren gegaan.

De resultaten van het placenta onderzoek zijn samengevat in tabel 6.13.

Tabel 6.13. Het voorkomen van intervillieuze thrombi en infarcten in 139 onderzochte placentas.

groep	aantal zwangeren	aantal placentas	placentas met	
			intervillieuze thrombi	infarcten
A	109	98	16	22
B	14	14	2	6
C	24	22	5	12
D	5	5	2	4
totaal	152	139	25	44

De aantallen van groep D zijn te klein voor statistische bewerking. Van de vier geïnfarceerde placentas waren er twee voor meer dan 5 % geïnfarceerd. Dit ging samen met de geboorte van, respectievelijk, een durante partu overleden kind en een kind met een gering geboortegewicht (zie ook tabel 6.7.).

Uit de tabel blijkt verder dat de frequentie van voorkomen van intervillieuze thrombi ongeveer gelijk is verdeeld over de verschillende groepen (16 % - 14 % - 23 %).

Dit is niet het geval voor de placenta infarcten; deze werden in 22 % van de placentas van zwangeren met een ongestoorde zwangerschap aangetroffen en in een significant groter aantal placentas (55 %) uit groep C; de verschillen tussen het voorkomen van infarcten in groep A en B, en in groep B en C zijn niet significant (χ^2 -toets). Om na te gaan wat de rol van de thrombocyten zou kunnen zijn geweest bij het ontstaan van het placenta infarct, werd in de groepen A en C het aantal thrombocyten, bepaald in het laatste trimester van de zwangerschap (zie 6.1.), in samenhang met het voorkomen van placenta infarcten nader geanalyseerd (tabel 6.14).

Hieruit blijkt dat placenta infarctering bij normale zwangeren samengaat met een significant (Student t-toets) verhoogd aantal thrombocyten. Ten tweede blijkt ook dat in groep C placenta infarctering in vergelijking met de normale zwangerschap zonder placenta infarcten gepaard gaat met een significant (Student t-toets) verhoogd aantal thrombocyten. Ten derde kan worden opgemerkt dat de zwangerschap, waaruit kinderen met een te laag geboortegewicht zijn geboren maar waarbij geen zichtbare placenta laesie in de zin van het placenta infarct is opgetreden, wel gepaard gaat met een hoger aantal thrombocyten dan de ongestoorde zwangerschap.

Tabel 6.14. Vergelijking van de aan- of afwezigheid van placenta infarcten in groep A en C met het aantal thrombocyten.

	groep A		groep C	
	placenta infarcten			
	aanwezig/afwezig		aanwezig/afwezig	
	22	76	12	10
aantal thrombocyten x 10 ⁹ /l				
\bar{X}	247	180	244	232
s.e.m.	17	6	19	15

Bespreking. Uit dit onderzoek blijkt, dat intervillieuze thrombi niet in relatie staan tot een bepaalde vorm van zwangerschapspathologie. Dit is in overeenstemming met gegevens uit de literatuur (Wallenburg, 1968). Ook de frequentie van voorkomen -ongeveer 16%- komt overeen met opgaven uit de literatuur (Fox, 1967; Wallenburg, 1968). Tevens blijkt, dat placenta infarcten worden aangetroffen in placentas van zwangeren met een ongestoorde zwangerschap, doch dat de frekwentie van voorkomen bij zwangeren met een te geringe foetale groei significant hoger ligt. Dit komt overeen met de mededelingen in de in hoofdstuk 2.2. besproken literatuur.

Opvallend is de bevinding dat placentainfarcering altijd samengaat met een hoger aantal thrombocyten, zowel in de ongestoorde als in de door onvoldoende foetale groei gecompliceerde zwangerschap.

6.6. Resultaten van de overige hematologische en chemische bepalingen.

Het verloop van het hemoglobinegehalte en van de hematocriet in de groepen A en C was onderling niet verschillend en

kwam overeen met gegevens uit de literatuur (Paintin et al., 1966; Lange en Dynesius, 1973), namelijk een daling tot ongeveer de 36e week met daarna een geleidelijke stijging. In de hypertensieve zwangerschap (groep B) lag de hematocriet gemiddeld hoger dan in de normale zwangerschap. Het fibrinogeengehalte lag in alle onderzochte groepen binnen de voor de zwangerschap als normaal beschouwde grenzen van 400 - 600 mg/100 ml (Bonnar, 1973). Het vrije cholesterol en de cholesterolesters verschilden niet duidelijk tussen de onderzochte groepen en lagen op het in de literatuur aangegeven niveau van 6.5 - 7.2 mmol/l (de Alvarez et al., 1959; Green, 1966). Reeds eerder (hoofdstuk 6.3) werd vermeld dat geen correlatie kon worden aangetoond tussen de resultaten van de filtragometrie en het hemoglobinegehalte, de hematocriet, het fibrinogeengehalte en de concentratie cholesterol en cholesterolesters in serum.

HOOFDSTUK 7.

SLOTBESCHOUWING EN CONCLUSIES.

In dit hoofdstuk zullen de in hoofdstuk 6 gepresenteerde resultaten in hun onderling verband en tegen de achtergrond van de in hoofdstuk 2 ontwikkelde hypothese nader worden geanalyseerd.

Op grond van deze hypothese werd verondersteld dat de structurele en hemodynamisch-rheologische veranderingen die zich tijdens de zwangerschap in de arteriën van het placentabed voordoen, bij de passerende thrombocyten een vermeerderde neiging tot *aggregatie* zouden kunnen induceren, die bij thrombocyten in het veneuze bloed zou kunnen worden aangetoond. Inderdaad blijkt uit de resultaten van de bepaling van aggregatie in vitro met behulp van ADP dat zwangeren, in vergelijking met niet-zwangeren, sneller een hogere maximale aggregatie bereiken bij een lagere eindconcentratie ADP. Uit het onderzoek met de Filtragometer blijkt verder dat de maximale aggregatie in de totale groep zwangeren duidelijk hoger ligt dan bij niet-zwangeren, hoewel het verschil juist niet significant is bij een onbetrouwbaarheidsdrempel van 5 %. Tenslotte wijst ook het voorkomen van spontane aggregatie bij zwangeren, terwijl dit bij niet-zwangeren in het geheel niet werd waargenomen, op een toegenomen neiging tot aggregatie. Nóch met ADP aggregatie, nóch met de Filtragometer konden echter verschillen worden aangetoond tussen zwangeren met een ongecompliceerde zwangerschap en die met hypertensie en/of een te geringe groei van de foetus.

Evenmin was het mogelijk om verschil in aggregatie aan te tonen tussen gevallen waarin de placenta na de geboorte infarkten vertoonde en gevallen waarin de placentas in het geheel geen infarkten vertoonden. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat het onbekend is op welk moment in de zwangerschap de betreffende uteroplacentaire arterie werd

afgesloten. Dit zou gebeurd kunnen zijn nã de bepaling van de aggregatie, dat wil zeggen dat het chronische arteriële thrombotische proces in een later stadium zou kunnen zijn verergerd.

Vergelijken we de twee gebruikte methoden voor de bepaling van thrombocyten aggregatie, dan kan worden gesteld, dat de ADP methode gevoeliger is dan de filtragometrie voor wat betreft het detecteren van de geringe veranderingen in de aggregatie bij zwangeren. Het is echter niet mogelijk om met één van beide methoden tijdig in de zwangerschap een toeneming van de thrombocyten aggregatie vast te stellen, op grond waarvan zou kunnen worden vermoed dat zich in de uteroplacentaire vaten veranderingen voordoen, die zouden kunnen leiden tot een placenta insufficiëntie. De vraag doet zich voor of de bepaling van thrombocyten aggregatie in de zwangerschap wordt beïnvloed door circulerende catecholamines of prostaglandines. Deze vraag kan ontkennend worden beantwoord. De concentratie circulerende catecholamines is bij de zwangere, behalve tijdens de baring, niet of nauwelijks hoger dan buiten de zwangerschap (Stone et al., 1960). Over de concentratie circulerende prostaglandines is weinig bekend. Wel weten wij dat prostaglandine $F_{2\alpha}$ geen aantoonbaar effect op de functie van bloedplaatjes heeft, terwijl het PGE_2 in geringe concentratie aggregatie-bevorderend kan werken (Salzman, 1972). Daarentegen zou het PGE_2 in hogere concentratie, zoals bij klinische toepassing voor inductie van de baring, de aggregatie remmen en waarschijnlijk thromboembolische processen voorkomen (Howie et al, 1973; Myatt en Elder, 1975). In tegenstelling hiermee hebben de cyclische prostaglandine endoperoxiden PGG_2 en PGH_2 , die in thrombocyten kunnen worden gevormd na een inducerende prikkel, een krachtige aggregerende werking. Dit zou kunnen betekenen dat thrombocyten die in het uteroplacentaire vaatbed worden "aangeslagen" snel overgaan tot de vorming van deze prostaglandine endoperoxiden en de aggre-

gatie ter plaatse bevorderen. Uit recent onderzoek van Moncada et al. (1976) blijkt echter dat deze aggregatie weer kan worden tegengegaan door een prostaglandine X (PGX), dat uit PGG_2 en PGH_2 in de vaatwand wordt gevormd. De trombocyten aggregatie zou ook kunnen worden gestimuleerd door circulerend thrombine. Volgens van Royen en ten Cate (1976) is in het derde trimester van de zwangerschap de "thrombin-like activity" in het veneuze bloed verhoogd. Deze auteurs suggereren dat dit een gevolg zou kunnen zijn van een lokaal stollingsproces in de intervillieuze ruimte (intervillieuze thrombi).

Op basis van onze hypothese werd tevens verondersteld, dat een thrombotisch proces in de uteroplacentaire arteriën zou kunnen leiden tot veranderingen in de *kinetiek* van de trombocyten, tot uiting komend in veranderingen in *aantal* en *levensduur*.

Inderdaad blijkt dat het aantal trombocyten per liter bloed in de groep vrouwen met een ongestoorde zwangerschap significant lager ligt dan dat bij de niet-zwangeren. Zoals reeds gezegd komt dit overeen met de resultaten van recente onderzoeken van van Royen (1974) en Sejeny (1975).

Wanneer wij echter deze groep vrouwen met een klinisch geheel ongestoord verlopen zwangerschap splitsen in twee subgroepen, één met placentas zonder infarcten en één met placentas met infarcten, dan blijkt het aantal trombocyten in de groep zonder placenta infarctering nog steeds laag te zijn (gemiddeld $180 \times 10^9/l$), doch in de groep met placenta infarcten significant hoger te liggen (gemiddeld $247 \times 10^9/l$). Voor een verklaring is het nodig om kort in te gaan op de kinetiek van trombocyten onder normale omstandigheden en op de veranderingen van het bloedvolume tijdens de normale zwangerschap. Onder normale omstandigheden is de totale trombocyten populatie verdeeld over twee compartimenten, namelijk het productiecompartiment, dat wordt gevormd door de megakaryocyten, en het circula-

tiecompartiment, de circulerende thrombocyten. Van de circulerende thrombocyten bevindt zich onder normale omstandigheden ongeveer 1/3 deel in de milt, met vrije uitwisseling naar de circulatie (Harker, 1974). De thrombocyten concentratie in het bloed is onder fysiologische condities vrij constant, $250 \pm 40 \times 10^9/l$; in combinatie met een levensduur van 9.5 ± 0.6 dagen betekent dit een turnover van ongeveer 27×10^9 bloedplaatjes per liter per dag (Harker, 1974).

In de normale zwangerschap neemt het totale bloedvolume toe met ongeveer 1200-1500 ml (Lange, 1973), dat wil zeggen dat een vrouw met een bloedvolume van ongeveer 4.7 l dit in de loop van een zwangerschap aanvult tot ongeveer 6 l, zodat er een verdunning optreedt van ongeveer 25 %. Betrekken wij deze gegevens op de thrombocyten concentratie in het bloed in de normale zwangerschap zonder placenta infarcten (gemiddeld $180 \times 10^9/l$), dan kan het ten opzichte van de niet-zwangere verminderde aantal thrombocyten per liter bloed door de verdunning worden verklaard. Stellen we dat het percentage thrombocyten dat zich in de milt bevindt gedurende de zwangerschap niet verandert, terwijl, zoals uit ons onderzoek is gebleken, ook de levensduur van de thrombocyten niet verandert, dan betekent dit dat de totale turnover tijdens de normale zwangerschap (ongeveer 118×10^9 thrombocyten per dag) gelijk is aan die van de groep niet-zwangere vrouwen (ongeveer 115×10^9 thrombocyten per dag).

Het is niet bekend wat de stimulus is voor de aanmaak van thrombocyten. In het algemeen wordt verondersteld, dat een vermindering van het aantal de belangrijkste prikkel vormt. Daarnaast is uit dierexperimenten bekend, dat een plasmafactor, thrombopoietine (Keleman et al., 1958) een rol kan spelen. Ook zou een verandering van een -nog onbekende-thrombocytenfunctie een aansporing kunnen zijn voor de megakaryocyt om jonge thrombocyten vrij te maken (Harker, 1974).

Deze laatste hypothese zou een verklaring kunnen geven voor het grotere aantal thrombocyten bij zwangeren met een ongestoorde zwangerschap doch met placenta infarctering. Het locale, pathologische proces in de uteroplacentaire arteriën dat uiteindelijk leidt tot afsluiting, zou een -door ons niet aangetoonde- verandering in de thrombocyten kunnen veroorzaken, die een prikkel vormt voor de megakaryocyten om meer thrombocyten in circulatie te brengen. Combineren wij bij deze zwangeren met placenta infarctering een normale levensduur van de thrombocyten met de normale toename van het bloedvolume en het verhoogde aantal thrombocyten per volume-eenheid, dan blijkt de totale turnover van de bloedplaatjes tot ongeveer 161×10^9 per dag te zijn, dat wil zeggen duidelijk hoger dan bij zwangeren zonder placenta infarctering.

Eenzelfde verklaring zou van toepassing kunnen zijn op onze bevindingen betreffende het aantal en de levensduur van thrombocyten in de groep zwangeren met kinderen met een te laag geboortegewicht. In deze groep is, in vergelijking met zwangeren met een ongecompliceerde graviditeit, het aantal thrombocyten per liter bloed verhoogd (gemiddeld $238 \times 10^9/l$) terwijl tevens de levensduur verkort is (gemiddeld 7.3 dagen). Uit de steekproef van de filtragometrie is gebleken dat bij deze groep, gezien de daling in de hematocriet, een fysiologische verdunning van het bloed optreedt van ongeveer 25 %. Dit betekent dat de turnover van bloedplaatjes van deze zwangeren ongeveer 193×10^9 per dag is. Dit is in overeenstemming met onze hypothese dat zich ten gevolge van de pathologische veranderingen in de uteroplacentaire arteriën ter plaatse plaatjes aggregaten vormen, waardoor thrombocyten worden verbruikt. Beschadigde thrombocyten, die aan de thrombusvorming ontsnappen, zouden de megakaryocyten kunnen stimuleren tot het in circulatie brengen van meer thrombocyten. Kennelijk wordt hierbij de productie dermate verhoogd dat, zelfs bij een verkorte gemiddelde levensduur, het gemiddelde aantal

circulerende thrombocyten toeneemt.

Beschouwen we de turnover van de bloedplaatjes van de verschillende groepen tezamen, dan zien we dat de vrouw met een ongestoorde zwangerschap zonder placenta infarkt (ongeveer 118×10^9 thrombocyten per dag) voor wat dit betreft niet afwijkt van de niet-zwangere vrouw (ongeveer 115×10^9 thrombocyten per dag). Het "incidentele" placenta infarkt dat geen invloed heeft op het gewicht van het kind, gaat samen met een verhoging in de turnover bij de moeder (ongeveer 161×10^9 thrombocyten per dag). Aannemend dat een onvoldoende groei van de foetus wordt veroorzaakt door een tekort aan voedingsstoffen, als gevolg van pathologische veranderingen in de wanden van de spiraalarteriën die resulteren in een vermindering van de totale uteroplacentaire circulatie, dan moet het placenta infarkt hierbij worden gezien als een lokaal symptoom van een gegeneraliseerde pathologie in het placentaire vaatbed. In overeenstemming met onze hypothese wordt dan ook in de zwangerschap die uiteindelijk resulteert in een kind met een te laag geboortegewicht, een hogere bloedplaatjes turnover gevonden (ongeveer 193×10^9 thrombocyten per dag) dan in de groep vrouwen met een normale zwangerschap met een placenta infarkt. Op grond van deze overwegingen is het niet verwonderlijk, dat geen verschil blijkt te bestaan tussen het aantal thrombocyten bij zwangeren met te geringe foetale groei zonder en die met infarcering van de placenta.

Tegen de achtergrond van deze discussie, waarin werkhypothese en resultaten van het onderzoek aan elkaar zijn getoetst kan worden *geconcludeerd* dat

- de ongecompliceerde zwangerschap mogelijk enige veranderingen veroorzaakt in de thrombocytenfunctie, in de zin van een toegenomen neiging tot aggregatie. Bij zwangeren met een ongestoorde graviditeit zonder placenta infarcering wijkt het totale aantal throm-

- bocytten niet af van dat van niet-zwangeren, hoewel het gemiddelde aantal bloedplaatjes per liter significant lager is dan bij de niet-zwangere. De gemiddelde levensduur van de thrombocyten is in de ongecompliceerde zwangerschap niet veranderd ten opzichte van die buiten de zwangerschap;
- placenta infarctering altijd samengaat met een significante verhoging van het gemiddelde aantal thrombocyten per liter ten opzichte van de zwangerschap zonder placenta infarctering. Aannemend dat het totale bloedvolume niet verschilt, resulteert dit in een hoger totaal aantal en een hogere turnover van de thrombocyten;
 - als de placenta infarctering uiting is van een gegeneraliseerd proces in de uteroplacentaire arteriën, dat wil zeggen gepaard gaat met symptomen van een verminderde uteroplacentaire circulatie in de vorm van te geringe foetale groei, leidt dit niet tot aantoonbare kwalitatieve veranderingen in de thrombocyten ten opzichte van de ongecompliceerde zwangerschap. Wel doen zich bij zwangeren met te geringe foetale groei veranderingen voor in de thrombocyten kinetiek, die zich uiten in een significante verkorting van de levensduur van de thrombocyten bij een significant toegenomen thrombocyten concentratie in het perifere bloed. De thrombocyten turnover is daardoor verhoogd.

De in hoofdstuk 2 ontwikkelde hypothese wordt met betrekking tot de ongecompliceerde zwangerschap, vooral indien placenta infarctering aanwezig is, en de door een te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap gesteund door de resultaten van ons onderzoek, vooral door die betreffende de kinetiek van de thrombocyten.

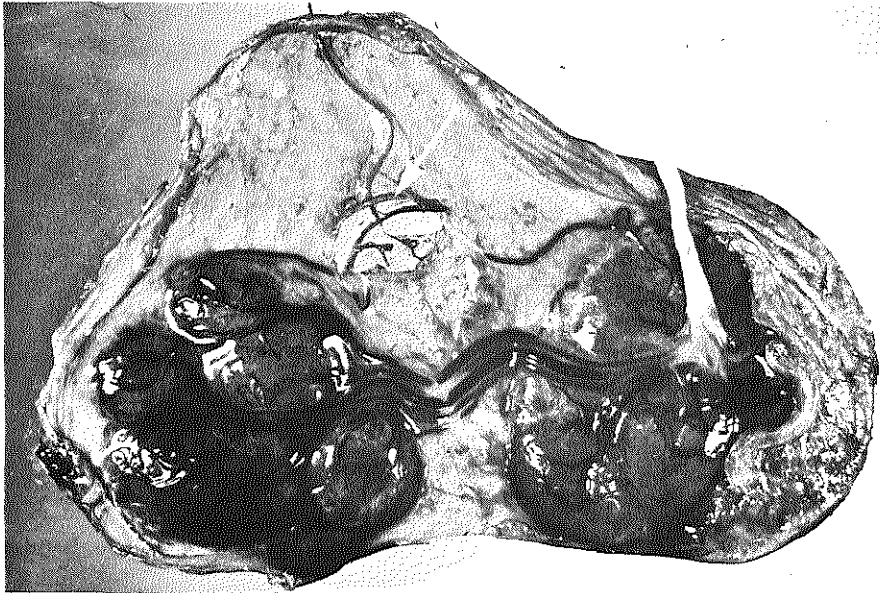
HOOFDSTUK 8. APPENDIX.

SCHATTING VAN DE FOETALE STRALINGSDOSIS NA TOEDIENING VAN ⁵¹Cr-THROMBOCYTEN AAN DE ZWANGERE: EEN EXPERIMENTEEL ONDERZOEK BIJ DE RHESUSAAP (MACACA MULATTA).

Zoals is uiteengezet in hoofdstuk 3.4. zou bepaling van de levensduur van met ⁵¹Cr gemerkte thrombocyten belangrijke informatie kunnen verschaffen over het al dan niet aanwezig zijn van een arteriëel thrombotisch proces in de uteroplacentaire circulatie. Dergelijk onderzoek is echter bij zwangeren nooit uitgevoerd, omdat niet bekend is in hoeverre bij de zwangere circulerende ⁵¹Cr-thrombocyten en ⁵¹Cr-ionen de foetale circulatie kunnen bereiken, zodat geen schatting kan worden gemaakt van de stralingsbelasting die dit onderzoek voor de foetus zou meebrengen. Een mogelijkheid om een onderzoek te doen naar de materno-foetale overgang van ⁵¹Cr-plaatjes en ⁵¹Cr-ionen bij de mens zou zijn het toedienen van autologe ⁵¹Cr-thrombocyten aan de zwangere kort voor de baring en het bepalen van ⁵¹Cr in navelstrengbloed van de pasgeborene. Wederom op grond van het feit dat de foetale stralingsbelasting niet bekend is, is deze methode ethisch niet aanvaardbaar. Methoden om zonder gebruik te maken van een radioisotoop bloedplaatjes betrouwbaar te merken konden in de literatuur niet worden gevonden. Daarom werd besloten om bij de zwangere rhesusaap als dierexperimenteel model de passage van ⁵¹Cr-thrombocyten en ⁵¹Cr-ionen van moeder naar foetus te onderzoeken.

De rhesusaap heeft meestal twee placentas, één tegen de voorzijde en één tegen de achterzijde van de uteruswand gelegen (Martin en Ramsey, 1970). De navelstreng insereert aan de primaire placenta, die via een aantal bundels

interplacentaire choriale vaten verbonden is met de secundaire placenta (figuur 8.1). De grote overeenkomst tussen de structuur van en de circulaties in de hemo-choriale placenta van de mens en die van de rhesusaap is overtuigend aangetoond (Ramsey en Harris, 1966; Arts en Lohman, 1974) zodat, met inachtneming van de nodige voorzichtigheid, de resultaten van onderzoek bij de zwangere rhesusaap op de mens kunnen worden overgebracht.



Figuur 8.1. De bidiscoidale placenta bipartita van de rhesusaap. Een bundel interplacentaire vaten is duidelijk zichtbaar. Een T-catheter is ingebracht in een interplacentaire vene (pijl).

8.1. Uitvoering van het onderzoek.

De experimenten werden uitgevoerd bij 5 zwangere rhesusapen (*Macaca Mulatta*), die werden verkregen van het Primaten Centrum TNO te Rijswijk-Z.H. De zwangerschaps-

duur, geschat op grond van de tijd waarin de paring plaatsvond en op basis van rectaal onderzoek, varieerde tussen 145 en 160 dagen. Bij 3 dieren werd een acuut experiment uitgevoerd, 2 dieren werden na langere tijd onderzocht.

De operatie. De 3 dieren, waarbij een acuut experiment werd gedaan, werden gedurende de 12 uur voorafgaande aan de operatie nuchter gehouden. Na premedicatie met phenacyclidine en atropine werd de trachea geintubeerd; volledige anesthesie werd verkregen door beademing met 0.2 tot 0.5 % fluothaan in zuurstof. Alle dieren kregen een waakinfuus van 0.9 % NaCl en met behulp van een electrisch verwarmde deken onder het dier werd afkoeling voorkomen. De zwangere uterus werd a vue gebracht via een mediane laparotomie. Vervolgens werd het silhouet van de beide placentas en van de interplacentaire vaten zichtbaar gemaakt door transilluminatie met twee sterke, geconcentreerde lichtbundels (Reynolds et al., 1954). Een foetale interplacentaire, choriale vene werd via een incisie in het myometrium vrijgeprepareerd, zonder dat de vruchtzak daarbij werd geopend, en het horizontale deel van een T-vormige silicone rubber catheter (inwendige diameter 0,8 mm, uitwendige diameter 1.3 mm) werd in de vene ingebracht (figuur 8.1). Op deze wijze kon foetaal bloed worden verkregen, zonder dat de circulatie werd onderbroken. Vervolgens werd de incisie in het myometrium geheel en de buikwond gedeeltelijk gesloten. Een 16-G polyvinyl catheter werd ingebracht in een vena saphena van de moeder en opgeschoven tot in de vena cava inferior. Na beëindiging van het experiment werd de foetus via sectio caesarea geboren. Twee foeten bleven in leven, één overleed kort na het einde van het experiment; het postoperatieve beloop was bij alle moederdieren ongestoord. Bij de 2 dieren die betrokken waren bij een experiment van langere duur, werd uitsluitend onder korte phency-

clidine analgesie een hoeveelheid ^{51}Cr -thrombocyten in de vena saphena ingebracht. Na 5 dagen werd een sectio caesarea uitgevoerd, waarbij monsters foetaal en moederlijk bloed, alsmede amnionvocht werden verkregen.

De bereiding, toediening en verwerking van autologe ^{51}Cr -thrombocyten. Moederlijke bloedplaatjes werden gemerkt met ^{51}Cr volgens de methode beschreven voor menselijke thrombocyten door Aster en Jandl (1964) en de Koning (1975). De labeling werd uitgevoerd in het Laboratorium voor Immunohematologie (Hoofd: Prof. Dr. J.J. van Rood) van de Rijksuniversiteit Leiden door collega A. Brand, aan wie wij daarvoor veel dank zijn verschuldigd. In het kort was de procedure als volgt. Van elk dier werd onder lichte analgesie met phencyclidine ongeveer 100 ml bloed afgenomen in ACD. Een plaatjesconcentraat werd bereid via differentiële centrifugering met toevoeging van overmaat ACD voor de tweede centrifugering. De erythrocyten werden aan het moederdier teruggegeven. Het plaatjesconcentraat werd geincubeerd met 150 μCi (^{51}Cr) natriumchromaat gedurende 30 minuten bij 22°C , vervolgens gewassen met plaatjesarm plasma (PPP) en geresuspendeerd in vers PPP. Op deze wijze werden van elk proefdier ^{51}Cr -thrombocyten verkregen met een activiteit van ongeveer 20 μCi in een volume van 4-5 ml plasma.

De ^{51}Cr -thrombocyten werden toegediend via de catheter in de vena cava inferior. Vervolgens werden gedurende een periode van 2 tot 3 uur met geregelde tussenpozen gelijktijdig monsters genomen van moederlijk (5 ml) en foetaal bloed (1 ml), via de respectievelijke catheters, en van vruchtwater (5 ml), via herhaalde punctie.

In de 2 chronische experimenten werden de gemerkte bloedplaatjes ingebracht in de moederlijke circulatie en werden bij de sectio caesarea na 5 dagen eenmalig en gelijktijdig monsters verkregen als in de acute experimenten.

De activiteit in alle bloedmonsters afkomstig van één experiment werd gelijktijdig bepaald in een "well-type" gamma scintillatie teller, met correcties voor achtergrondstraling. In het moederlijke bloed werd de activiteit in de totale celfractie, in de erythrocyten en in het plaatjesarme plasma apart gemeten. Het bleek dat in de erythrocyten geen activiteit van enige betekenis kon worden aangetoond; de hoeveelheid aan plaatjes gebonden radioactiviteit kon daarom worden berekend door van de activiteit gemeten in de totale celfractie, de activiteit van de geschatte 20 % van het totale volume PPP, dat aan de cellen was blijven hangen, af te trekken. Bij de telling van de foetale bloedmonsters werd dezelfde procedure toegepast, behalve dat de activiteit in de erythrocytenfractie niet apart kon worden gemeten wegens het geringe volume van het bloedmonster.

Gebaseerd op het gewicht van het moederdier werden het moederlijke bloedvolume en het volume van het vruchtwater geschat (Seeds et al., 1967), terwijl het foetoplacentaire bloedvolume werd geschat op basis van het gewicht van de foetus (Pitkin en Reynolds, 1975). Op grond hiervan kon de hoeveelheid radioactiviteit, gemeten in moederlijk en foetaal bloed en in vruchtwater, worden berekend als een percentage van de toegediende dosis.

8.2. Resultaten.

In tabel 8.1. is de concentratie radioactiviteit in bloed en/of plasma weergegeven als de verhouding tussen de concentratie radioactiviteit in elk monster en die in de totale hoeveelheid toegediende ^{51}Cr -thrombocyten. Met behulp van deze gegevens kan het percentage van de ingebrachte dosis, dat in het geschatte volume van elk van de compartimenten werd teruggevonden, worden berekend.

Na 8 minuten werd tussen 70 en 98 % van de totale toegediende dosis radioactiviteit in het moederlijk bloed teruggevonden; na 2 uur was nog steeds tussen 70 en 90 %

aanwezig. Bij 2 proefdieren was respectievelijk 30 en 20 % van de toegediende hoeveelheid radioactiviteit na 5 dagen nog in het moederlijk bloed aanwezig.

In de 2 tot 3 uur na injectie van de gemerkte plaatjes in de moederlijke vena cava werd ongeveer 1-3 % van de totale in het moederlijk bloed aanwezige radioactiviteit aangetroffen in het plaatjesarme plasma; na 5 dagen was de plasma activiteit respectievelijk 5 en 7 % van de totale activiteit in het moederlijk bloed.

In géén van de foetale monsters kon radioactiviteit in de cel fractie worden aangetoond. De concentratie radioactiviteit in het foetale plasma variëerde tussen 3 en 10 % van de concentratie in het moederlijke plasma gedurende 2 tot 3 uur na injectie van de ^{51}Cr -thrombocyten, behalve bij aap no. 2323, waar na 2 uur de activiteit opliep tot 22 %. Op basis van het geschatte foetale plasmavolume kan worden berekend, dat de totale bij de foetus circulerende hoeveelheid activiteit variëerde tussen 0.003 % van de totale aan de moeder toegediende dosis na 8 minuten en rond 0.03 % na 5 dagen.

Bij geen van de dieren werd in het vruchtwater na 8 minuten radioactiviteit aangetoond. Na 30 minuten tot 3 uur werd bij 2 dieren een geringe hoeveelheid radioactiviteit in het vruchtwater gevonden. In één vruchtwatermonster, verkregen 5 dagen na toediening van de ^{51}Cr -thrombocyten aan de moeder werd, berekend op het totale vruchtwater-volume van 70 ml, 0.01 % van de aan de moeder toegediende dosis radioactiviteit teruggevonden.

8.3. Bespreking en conclusie.

Wanneer wij aannemen dat ^{51}Cr gemerkte thrombocyten zich gedragen als ongemerkte bloedplaatjes, blijkt dat moederlijke thrombocyten de hemochoriale placenta van de rhesusaap in de door ons gebruikte experimentele opstelling niet passeren. Vrije ^{51}Cr -ionen in het plasma blijken de

hemochoriale placenta wel vlot te passeren, dit in tegenstelling tot de observatie dat de hemotrichoriale placenta van de rat praktisch ondoorlaatbaar is voor Cr-ionen (Assali et al., 1968).

Op grond van de bevinding dat aan thrombocyten gebonden ^{51}Cr de placenta niet passeert en dat de som van de totale in de foetus circulerende radioactiviteit en de activiteit in het vruchtwater in alle gevallen minder is dan 1 % van de aan de zwangere rhesusaap toegediende radioactiviteit, kan de foetale stralingsdosis worden geschat*. De totale dosis straling die de foetus ontvangt zal gelijk zijn aan de straling, ontvangen van de radio-isotoop aanwezig in de moederlijke weefsels (compartiment A) en van die, ontvangen van de vrije ^{51}Cr -ionen die zijn overgegaan naar de foetus en het vruchtwater (compartiment B).

De biologische halfwaardetijd (T_{biol}) van ^{51}Cr in compartiment A kan veilig worden geschat op 30 dagen, op grond van gegevens betreffende ^{51}Cr -erythrocyten met 50 % opneming in de milt (IRCP, 1971). De fysische halfwaardetijd (T_{fys}) van ^{51}Cr is 27.8 dagen. De effectieve halfwaardetijd (T_{eff}) van het ^{51}Cr in compartiment A kan dan worden berekend en is gelijk aan 15 dagen.

Omdat de snelheid waarmee de foetus het ^{51}Cr elimineert onbekend en waarschijnlijk gering is, wordt T_{biol} in compartiment B gesteld op oneindig: T_{eff} in compartiment B is dan dus gelijk aan $T_{\text{fys}} = 27.8$ dagen.

Compartiment A bevat tenminste 99 % van de totale toegediende hoeveelheid radioactiviteit, dus:

(1) $15 \times 0.99 \times 1.44 = 21 \mu\text{Ci}$ dagen voor een dosis van 1 μCi . De factor 1.44 geeft de integraal aan waarmee het initiële activiteitsverval moet worden vermenigvuldigd om

* Wij danken Prof.Dr.L.M. van Putten, Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk-Z.H., voor zijn hulp bij de berekening.

het totale verval te verkrijgen. Compartiment B bevat niet meer dan 1 % van de totale hoeveelheid toegediende radioactiviteit, dus:

$$(2) 27.8 \times 0.01 \times 1.44 = 0.40 \text{ } \mu\text{Ci dagen.}$$

Hiermee kan de dosis radioactiviteit die de foetus zal ontvangen (in rem per μCi dag) worden berekend door vergelijking en interpolatie met behulp van bestaande tabellen (MIRD, 1975). Uitgaande van (1) zal de foetus uit compartiment A ontvangen:

$$(3) 21.4 \times 1.2 \times 10^{-5} = 0.25 \text{ mrem}/\mu\text{Ci.}$$

De dosis die de foetus ontvangt uit compartiment B is afhankelijk van het foetale gewicht. Voor een foetus van 300 gram is de dosis 2.2×10^{-3} rem/ μCi , wat uitgaande van (2) resulteert in:

$$(4) 0.40 \times 2.2 \times 10^{-3} = 0.9 \text{ mrem}/\mu\text{Ci.}$$

Voor een foetus van 1700 gram levert deze berekening op:

$$(5) 0.40 \times 2.9 \times 10^{-4} = 0.12 \text{ mrem}/\mu\text{Ci.}$$

Door het toedienen van $20 \text{ } \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ -gemarkte thrombocyten aan het moederdier, zoals in de hier beschreven experimenten, zal de ongeveer 300 gram wegende foetus van de rhesusaap dus een stralingsdosis ontvangen, gelijk aan de som van de straling uit compartiment A (3) en die uit compartiment B (4), dus:

$$(6) 20 \times (0.25 + 0.9) = 23 \text{ mrem.}$$

Wanneer wij de resultaten van ons onderzoek bij de zwangere rhesusaap extrapoleren naar de zwangere vrouw met een foetus van 1700 gram, d.w.z. bij een zwangerschapsduur van omstreeks 31 weken, dan zou dit betekenen dat de dosis straling die de foetus ontvangt uit compartiment A niet verandert (3), terwijl de bijdrage uit compartiment B $0.12 \text{ mrem}/\mu\text{Ci}$ (5) zou zijn. De totale foetale stralingsdosis zou dan zijn:

$$(7) 20 \times (0.25 + 0.12) = 7.4 \text{ mrem.}$$

Het is duidelijk dat de dosis voor zwaardere foeten minder wordt. De in dit voorbeeld berekende dosis van 7.4 mrem

bedraagt ongeveer een kwart van de gonadenbelasting die wordt toegediend wanneer men bij een pasgeboren meisje een buikoverzichtfoto maakt (ongeveer 30 mrem).

Als wij uitgaan van de juistheid van de analogie tussen de placentatie van mens en rhesusaap, zou dit dus betekenen dat de foetale stralingsdosis ten gevolge van toediening van 20 μ Ci autologe ^{51}Cr -thrombocyten aan een zwangere zo gering is, dat deze methode zou kunnen worden toegepast ter bepaling van de overlevingsduur van thrombocyten in het derde trimester van de zwangerschap.

SAMENVATTING.

In hoofdstuk 1 is het doel van het onderzoek aangegeven. Over de functie en kinetiek van thrombocyten in de zwangerschap is weinig bekend. Op grond van de structuur en de hemodynamiek van de uteroplacentaire circulatie kan de hypothese worden opgesteld (zie hoofdstuk 2) dat thrombocyten in de zwangerschap kwalitatieve en kwantitatieve veranderingen zouden kunnen ondergaan. Er kan worden verwacht dat deze veranderingen het meest uitgesproken zullen zijn in de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap. De vraagstelling van het onderzoek is daarom, ten eerste of er in de functie van thrombocyten voor wat betreft de aggregatie en in de kinetiek voor wat betreft aantal en levensduur veranderingen kunnen worden aangetoond bij zwangeren in vergelijking met niet-zwangeren; ten tweede of deze veranderingen in de ongestoorde zwangerschap verschillen van die in de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap.

In hoofdstuk 2 wordt de werkhypothese aan de hand van literatuurgegevens nader uiteengezet. De fysiologische veranderingen in de structuur van de wand van de uteroplacentaire arteriën ontstaan waarschijnlijk onder invloed van trofoblast invasie en leiden onder andere tot turbulentie van de bloedstroom. Hierdoor ontstaan gunstige voorwaarden voor het optreden van thrombocyten aggregatie. In de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap worden pathologische veranderingen aangetroffen in de structuur en functie van de uteroplacentaire circulatie. Atheromatose en/of vaatspasmen van de uteroplacentaire arteriën, die zich onder meer uiten in het optreden van placenta infarcting, zullen eveneens en waarschijnlijk in meerdere mate dan de fysiologische veranderingen kunnen leiden tot beschadiging van

thrombocyten.

Op grond van deze hypothese wordt verwacht dat in de normale en in meerdere mate in de pathologische zwangerschap, veranderingen in de functie en de kinetiek van thrombocyten zullen kunnen worden aangetoond.

In hoofdstuk 3 wordt de bruikbaarheid voor ons onderzoek besproken van een aantal methoden ter bepaling van de functie en de levensduur van thrombocyten.

Bepaling van de bloedingstijd en de plaatjes-adhesiviteit lijkt voor de beantwoording van onze vraagstelling minder geschikt.

De meting van de ADP-aggregatie in vitro met behulp van de aggregometer wordt besproken. De Filtragometer maakt het mogelijk om op betrekkelijk eenvoudige wijze, direct in vivo thrombocyten aggregatie in veneus bloed te meten. Uit de besproken literatuurgegevens wordt geconcludeerd dat voor ons onderzoek ter bepaling van de aggregatie de ADP-aggregatie en de filtragometrie het meest geschikt zijn. Algemeen wordt de levensduur van thrombocyten bepaald met behulp van ⁵¹Cr-gemerkte bloedplaatjes. Toediening van radioisotopen aan gezonde zwangeren is echter weinig aantrekkelijk. Een geheel nieuwe techniek berust op een irreversibele remming van de prostaglandine synthese in thrombocyten na toediening van een enkelvoudige dosis acetosal. Dit effect is op betrouwbare wijze te bepalen door de MDA concentratie in thrombocyten te meten. Malondialdehyde (MDA) is een stabiel eindproduct in de prostaglandine synthese. Op grond van de literatuurgegevens lijkt een eenmalige dosis acetosal van 500 mg géén gevaar in te houden voor de zwangere of haar kind in utero. De methode biedt een goed alternatief om de levensduur van thrombocyten in de zwangerschap te bepalen.

In hoofdstuk 4 worden de gebruikte criteria voor de selectie van de proefpersonen vermeld. De ongestoorde zwan-

gerschap, de door hypertensie en/of te geringe foetale groei gecompliceerde zwangerschap en de beide niet-zwangere groepen worden gedefinieerd.

In hoofdstuk 5 wordt de methodiek van het eigen onderzoek besproken. Achtereenvolgens worden de uitvoering van de thrombocytentelling, de ADP-aggregatie, de filtragometrie, de bepaling van de thrombocyten levensduur met behulp van de acetosal-methode en het placenta onderzoek beschreven. De bij de evaluatie van elke onderzoeksmethode gehanteerde parameters worden aangegeven.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten van het eigen onderzoek besproken. In totaal hebben 210 proefpersonen deelgenomen aan verschillende onderdelen van het onderzoek. Het meest opvallende resultaat van de telling van het aantal thrombocyten is dat de zwangerschap, die gepaard gaat met placenta-infarcering, een significant hoger aantal thrombocyten per liter heeft dan de ongestoorde zwangerschap zonder placenta infarkt. Dit komt uit verschillende steekproeven naar voren.

Het ADP-aggregatie onderzoek heeft aangetoond dat thrombocyten bij zwangeren ten opzichte van niet-zwangeren een verhoogde neiging tot aggregatie vertonen. Voor wat betreft de ADP-aggregatie resultaten verschillen de gestoorde en ongestoorde zwangerschap niet van elkaar. Uit het onderzoek met de Filtragometer komen geen significante verschillen in aggregatie naar voren tussen de verschillende onderzochte groepen.

Uit de bepaling van de levensduur van thrombocyten blijkt dat deze significant verkort is in zwangerschappen, gecompliceerd door een te geringe foetale groei; de gemiddelde levensduur van bloedplaatjes van normale zwangeren verschilt niet van die van niet-zwangere vrouwen of mannen.

In hoofdstuk 7 volgt de slotbeschouwing waarin de resultaten van ons onderzoek van de functie en kinetiek van thrombocyten in hun onderling verband en tegen de achtergrond van de werkhypothese nader zijn geanalyseerd.

Het verband tussen aantal en levensduur van de thrombocyten wordt weergegeven in de berekening van de totale turnover. Deze verschilt bij de zwangere met een ongestoorde zwangerschap zonder placenta infarct niet van die van de niet-zwangere vrouw. Daarentegen is de totale turnover gemiddeld hoger in zwangerschappen die gepaard gaan met een placenta infarct. In zwangerschappen met een te geringe foetale groei wordt een nog hogere gemiddelde totale turnover gevonden.

De belangrijkste *conclusies* die uit het onderzoek getrokken kunnen worden zijn dat:

- de ongecompliceerde zwangerschap mogelijk enige veranderingen veroorzaakt in de thrombocytenfunctie, in de zin van een toegenomen neiging tot aggregatie. Bij zwangeren met een ongestoorde graviditeit zonder placenta infarctering wijkt het totale aantal thrombocyten niet af van dat van niet-zwangeren, hoewel het gemiddelde aantal bloedplaatjes per liter significant lager is dan bij de niet-zwangere. De gemiddelde levensduur van de thrombocyten is in de ongecompliceerde zwangerschap niet veranderd ten opzichte van die buiten de zwangerschap;
- placenta infarctering altijd samengaat met een significante verhoging van het gemiddelde aantal thrombocyten per liter ten opzichte van de zwangerschap zonder placenta infarctering. Aannemend dat het totale bloedvolume niet verschilt, resulteert dit in een hoger totaal aantal en een hogere turnover van de thrombocyten;
- als de placenta infarctering uiting is van een generaliseerd proces in de uteroplacentaire arteriën, dat

wil zeggen gepaard gaat met symptomen van een verminderde uteroplacentaire circulatie in de vorm van te geringe foetale groei, leidt dit niet tot aantoonbare veranderingen in de trombocyten aggregatie ten opzichte van de ongecompliceerde zwangerschap. Wel zijn er bij zwangeren met te geringe foetale groei veranderingen in de trombocyten kinetiek, zich uitend in een significante verkorting van de levensduur van de trombocyten bij een significant toegenomen trombocyten concentratie in het perifere bloed. De trombocyten turnover is daardoor verhoogd.

In hoofdstuk 8 zijn als appendix de resultaten opgenomen van een experimenteel onderzoek bij zwangere rhesusapen naar de foetale stralingsdosis na toediening van ^{51}Cr trombocyten aan de moeder. Deze methode wordt bij de mens toegepast voor bepaling van de bloedplaatjes levensduur. Na een uiteenzetting van de uitvoering van de operatie en van het merken van de moederlijke trombocyten met ^{51}Cr worden de resultaten van 5 dierexperimenten besproken. In de gebruikte experimentele opstelling kon geen overgang van trombocyten van moeder naar foetus worden aangetoond. Vrije ^{51}Cr -ionen blijken de hemochoriale placenta wel te passeren. Op grond van de hoeveelheid radioactiviteit in de moeder, de foetus en het vruchtwater kan de foetale stralingsdosis worden geschat. Aannemend dat de resultaten van dit onderzoek kunnen worden geextrapoleerd naar de mens wordt geconcludeerd, dat de foetale stralingsdosis, na toediening van ongeveer 20 μCi autologe ^{51}Cr -bloedplaatjes aan de moeder, bij een zwangerschapsduur van omstreeks 31 weken ongeveer 7 mrem zal bedragen.

Chapter 5 presents the methods used in this investigation. The techniques are described of platelet counting, ADP-aggregation, filtragometry, determination of platelet life span and examination of the placenta. The parameters applied to the evaluation of the respective methods are presented.

Chapter 6 deals with the results of the study. A total of 210 individuals was involved in the various parts of the investigation. Regarding platelet count it appears from different samples that in pregnancies with placental infarction the mean number of platelets per liter of blood is significantly higher than in pregnancies without placental infarction. The results of ADP-aggregation indicate that in pregnancy platelets have an increased tendency to aggregation as compared with the nonpregnant state. No differences in ADP-aggregation could be demonstrated between normal and pathologic pregnancy. Determination of in-vivo platelet aggregation by means of the Filtragometer failed to reveal significant differences between any of the groups studied.

Platelet life span appears to be significantly shortened in pregnancies complicated by insufficient fetal growth, whereas mean platelet life span in normal pregnancy is not different from that in nonpregnant women or in men.

In chapter 7 the results of our study of platelet function and kinetics are considered in their entirety and against the background of the previously established working hypothesis. The relationship between platelet number and life span is expressed in the platelet turnover. Platelet turnover in pregnant women without placental infarction appears to be the same as in nonpregnant women. An increased platelet turnover is found in normal pregnancies with placental infarction, whereas an even higher turnover is encountered in pregnancies with insufficient fetal growth.

The results of the study permit the following *conclusions*:

- Normal pregnancy may cause slight changes in platelet function to the effect of an increased tendency to aggregation. In women with normal pregnancy and without placental infarction the total number of platelets appears to be the same as in nonpregnant women, although the mean platelet count per liter of blood is significantly lower than in nonpregnant individuals. Mean platelet life span in normal pregnancy does not differ from that in the nonpregnant state.
- Placental infarction is associated with a significant elevation of the mean number of platelets per liter, in comparison with pregnancies without placental infarction. Assuming that total blood volume is the same, placental infarction is therefore associated with an elevated total number of platelets with an increased platelet turnover.
- Placental infarction occurring as a symptom of a generalized pathologic process in the uteroplacental arteries, i.e. associated with insufficient fetal growth, does not involve changes in platelet aggregation which differ from those in normal pregnancy. However, in these cases a significantly elevated platelet count in combination with a significantly shortened life span accounts for a marked increase in platelet turnover.

In chapter 8 the results are presented of an experimental study in pregnant rhesus monkeys. The study was designed to estimate the radiation dose delivered to the fetus due to administration of ^{51}Cr -labeled platelets to the mother, a method used for determination of platelet life span in man. Following a description of the surgical procedure and the technique of ^{51}Cr -labeling of maternal platelets, the results of 5 experiments are presented and discussed.

Under the conditions of these experiments no placental transfer of platelets from mother to fetus could be demonstrated but free ^{51}Cr -ions appear to cross the placenta. The fetal radiation dose is estimated on the basis of the amount of radioactivity present in the mother, in the fetus, and in the amniotic fluid. On the assumption that the results of this animal study can be extrapolated to man, the radiation dose received by a 31 weeks' fetus following administration of 20 μCi of autologous ^{51}Cr -labeled platelets to the mother can be estimated to be approximately 7 mrem.

LITERATUURLIJST.

- AAS, K., GARDNER, F.H. (1958): Survival of blood platelets labeled with chromium⁵¹, *J.clin.Invest.* 37: p. 1257.
- ABRAHAMSEN, A.F., EIKA, C., GODAL, H.C., LORENTSEN, E. (1974): Effect of acetylsalicylic acid and dipyridamole on platelet survival and aggregation in patients with atherosclerosis obliterans. *Scand. J.Haemat.* 13: p. 241.
- ALVAREZ, R.R. de, et al. (1959): Serial studies of serum lipids in normal human pregnancy. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 77: p. 743.
- ARTS, N.F.Th., LOHMAN, A.H.M. (1974): An injection-corrosion study of the fetal and maternal vascular systems in the placenta of the rhesus monkey. *Europ.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 4: p. 133.
- ASSALI, N.S., DILTS Jr., P.V. et al. (1968): Physiology of the placenta. In: *Biology of Gestation*, volume I, p. 262. Editor: Assali, N.S., Academic Press, New York.
- ASTER, R.A., JANDL, J.H. (1964): Platelet sequestration in man. I. Methods. *J.clin.Invest.* 43: p. 843.
- BEAUMONT, J.L., WILLIE, A. (1955): Influence sur l'hémostase, de l'hypertension artérielle, des antivitamines K, de l'héparine et de l'acide acétyl salicylique. *Sangue*, 26: p. 880.
- BLEYER, W.A., BRECKENRIDGE, R.T. (1970): Studies on the detection of adverse drug reactions in the newborn. *J.amer.med.Ass.* 213: p. 2049.
- BOLTE, A., HILDER, H.J., NEBEL, N., SCHLEUSKER, K.H. (1976): Die kindliche Entwicklung nach Plazentadysfunktion. *Arch.Gynäk.* 220: p. 227.
- BONNAR, J. (1973): Blood coagulation and fibrinolysis in obstetrics. *Clin.Haematol.* 2: p. 213.
- BONNAR, J., REDMAN, C.W.G., SHEPPARD, B.L. (1975): Treatment of fetal growth retardation in utero with heparin and dipyridamole. *Europ. J.Obstet.Gynec.Reprod.Biol.* 5: p. 123.
- BORN, G.V.R. (1962): Aggregation of blood platelets by adenosinediphosphate and its reversal. *Nature, Lond.* 194: p. 927.
- BOYD, J.D., HAMILTON, W.J. (1967): Development and structure of the human placenta from the end of the 3rd month of gestation. *J. Obstet.Gynaec.brit.Cwlth.* 74: p. 161.
- BROERSMA, R.J., DICKERSON, G.D., SULLIVAN, M.S. (1973): The determination of platelet aggregation by filtration pressure in circulating dog blood. *Thromb.Diath.haemorrh. (Stuttg.)*, 29: p. 201.
- BROSENS, I. (1964): A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. *J.Obstet. Gynaec.brit. Cwlth.*, 71: p. 222.
- BROSENS, I., ROBERTSON, W.B., DIXON, H.G. (1967): The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J.Path.Bact.* 93: p. 569.
- BROSENS, I., RENAER, M. (1972): On the pathogenesis of placental infarcts in preeclampsia. *J.Obstet.Gynaec.brit.Cwlth.* 79: p. 794.
- BURTON, A.C. (1972): *Physiology and Biophysics of the Circulation.* Year Book Medical Publishers, p. 104.

- BUYSE, F.G.C., WORMGOOR, B.H., BERNARD, J.Th., KOUDSTAAL, J. (1974): Anticoagulant therapy of patients with repeated placental infarction. *Obstet.Gynec.* 43: p. 844.
- CASTEELS-VAN DAELE, M., JACKEN, J., EGGERMONT, E. (1972): More on the effects of antenatally administered aspirin on aggregation of platelets of neonates. *J. Pediat.* 80: p. 685.
- CATE, J.W. ten (1972): Platelet function tests. *Clin.haematol.* 1: p. 283.
- CATE, J.W. ten, VRIES, S.I. de, SIXMA, J.J., BERKEL, W. van (1972): Reproducibility and normal values of various platelet function tests. *Folia med.neerl.* 15: p. 10.
- COHEN, L.S. (1976): Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. In: *Current Cardiovascular Topics*, p. 166. Editors: Donoso, E., Haft, J.I. Georg Thieme Publ. Stuttgart.
- CORBY, D.G., SCHULMAN, J. (1971): The effects of antenatal drug administration on aggregation of platelets of newborn infants. *J.Pediat.* 79: p. 307.
- DAVIE, R., BUTLER, N.R., GOLDSTEIN, H. (1972): From birth to seven: The second report of the National Child Development Survey. Longman, London.
- DAWES, G.S. (1974): The causes of small-for-dates births. In: *Size at Birth*, p. 393. CIBA Foundation, Excerpta Medica, Amsterdam.
- DROGENDIJK, A.C. (1967): Over de pathogenese van bloedingen in het placentabed in de tweede helft van de zwangerschap. Proefschrift, Utrecht.
- EIKA, C. (1973): Anticoagulant and platelet aggregating activities of heparin. *Thrombosis Res.* 2: p. 349.
- EVANS, G. et al. (1968): The effect of acetylsalicylic acid on platelet function, *J.exp.Med.* 128: p. 877.
- FITZGERALD, D.E. et al. (1971): Platelet adhesiveness: post myocardial infarction. Patients compared with controls. *Atherosclerosis*, 13: p. 217.
- FLEISCHMAN, A.J., BIERENBAUM, M.L., JUSTICE, D. et al. (1975a): Titrating dietary linoleate to in vivo platelet function in man. *Amer. J.Clin.Nutr.* 28: p. 601.
- FLEISCHMAN, A.J., JUSTICE, D., BIERENBAUM, M.L. et al. (1975b): Beneficial effect of increased dietary linoleate upon in vivo platelet function in man. *J.Nutr.* 105: p. 1286.
- FOX, H. (1967): The significance of placental infarction in perinatal morbidity and mortality. *Biol.Neonat.* (Basel) 11: p. 87.
- FOX, H. (1976): The histopathology of placental insufficiency. *J.clin. Path.* 29, Suppl. (Roy.Coll.Path): p.1.
- FRANKLIN, G.O., DOWD, A.J., CALDWELL, B.V. en SPEROFF, L. (1974): The effect of angiotensin-II intravenous infusion on plasma renin activity and prostaglandins A, E and F levels in the uterine vein of the pregnant monkey. *Prostaglandins*, 6: 271.
- FREESE, U.E. (1968): The uteroplacental vascular relationship in the human. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 101: p. 8.

- FREESE, U.E., MACIOLEK, B.J. (1969): Plastoid injection studies of the uteroplacental vascular relationship in the human. *Obstet. Gynec.* 86: p. 226.
- FRIGOLETTO, F.D., TULLIS, J.L., REID, D.E., HINMAN, J. (1971): Hypercoagulability in the dysmature syndrome. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 111: p. 867.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. (1970): The pharmacological basis of therapeutics. Fourth Edition, p. 314.
- GREEN, J.G. (1966): Serum cholesterol changes in pregnancy. *Amer.J. Obstet.Gynec.* 95: p. 387.
- HADDEMAN, E. (1976). Persoonlijke mededeling.
- HAEREM, J.W. (1974): Platelet aggregates and mural microthrombi in the early stages of acute, fatal coronary disease. *Thrombos.Res.* 5: p. 243.
- HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSON, B. (1974): Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc.nat.Acad.Sci., USA.*71: p. 3824.
- HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSON, B. (1975): Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc.nat.Acad.Sci., USA* 72: p. 2994.
- HARKER, L.A., and SLICHTER, S.J. (1971): The standardized bleeding time as a measure of platelet function in vivo. *Abstr.Congr.Int. Society Thrombos and Haemat. (Oslo)*: p. 78.
- HARKER, L.A., SLICHTER, S.J. (1972): Platelet and fibrinogen consumption in man. *New Engl.J.Med.* 287: p. 999.
- HARKER, L.A., SLICHTER, S.J. (1974): Arterial and venous thromboembolism: kinetic characterization and evaluation of therapy. *Thromb.Diath. haemorrh. (Stuttg.)* 31: p. 188.
- HARKER, L.A. (1974): Control of platelet production. In: *Annual review of medicine.* vol. 25, p. 383. Editor: Creger, W.P.
- HASLAM, R.R., EKERT, H., GILLAM, G.L. (1974): Hemorrhage in a neonate possibly due to maternal ingestion of salicylate. *J.Pediat.* 84: p. 556.
- HELLEM, A.J. (1970): Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. A study with a new modification of the glass bead filter method. *Scand.J.Haemat.* 7: p. 374.
- HEMEL, O.J.S. van (1977): An obstetric database, human factors, design and reliability. Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- HORNSTRA, G. (1970): Method to determine the degree of ADP-induced platelet aggregation in circulating rat blood ("Filterloop Technique"). *Brit.J. Haemat.* 19: p. 321.
- HORNSTRA, G. (1971): The influence of dietary sunflowerseed oil and hardened coconut oil on intra-arterial occlusive thrombosis in rats. *Nutr.Metabol.* 13: p. 140.
- HORNSTRA, G., GIELEN, S.Y. (1972): Measurement of platelet aggregation and thrombus formation in circulating blood. *Adv.Exp.Med.Biol.* 34: p. 321.
- HORNSTRA, G. et al. (1973): Influence of dietary fat on platelet function in man. *Lancet*, 1: p. 1155.
- HORNSTRA, G., GIELEN, S.Y. (1974): Measurement of platelet aggregation in flowing blood with the use of a filter. *Path.Biol.* 22, suppl.: p. 11.

- HORNSTRA, G., HOOR, F. ten (1975): The Filtragometer: A new device for measuring platelet aggregation in venous blood of man. *Thromb.diath. haemorrh.* 34: p. 531.
- HORNSTRA, G., HADDEMAN, E. (1977): Effects of dietary fats on the role of platelets in arterial thromboembolism. In: *Platelets and Thrombosis, Proceedings Sernonosymposium, 1976. Acad.Press New York* (in press).
- HOWIE, P.W., CALDER, A.A., FORBES, C.D., PRENTICE, C.R.M. (1973): Effect of intravenous prostaglandin E₂ on platelet function, coagulation and fibrinolysis. *J.clin.Path.* 26: p. 354.
- HOWIE, P.W., PRENTICE, C.R.M., FORBES, C.D. (1975): Failure of heparin therapy to affect the clinical course of severe pre-eclampsia. *Brit.J.Obstet. Gynec.* 82: p. 711.
- IRCP (1971): Protection of the patient in radionuclide investigations. IRCP Publication, 17, Oxford, New York, Pergamon Press.
- JACKSON, A.V. (1948): Toxic effects of salicylate on the foetus and mother. *J.Path.Bact.* 60: p. 587.
- JONG, P.A. de (1975): Het neurologische onderzoek van de pasgeborene volgens Prechtl en Beintema als graadmeter van het verloskundig handelen. Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- JONGE, H. de (1963): Inleiding tot de Medische Statistiek, deel I en II.
- JØRGENSEN, L., HAEREM, J.W., MØE, N. (1973): Platelet thrombosis and non-traumatic injury in mouse aorta. *Thromb.Diath.haemorrh.* (Stuttg.) 29: p. 470.
- KANESHIRO, M.M., MIELKE, C.H., KASPER, C.K., RAPAPORT, S.I. (1969): Bleeding time after aspirin in disorders of intrinsic clotting. *New Engl.J.Med.* 281: p. 1039.
- KELEMAN, E., CSERHATI, I., TANOS, B. (1958): Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocytaemic sera. *Acta Haematol.* 20: p. 350.
- KOHN, H.J., LIVERSEGE, M. (1944): On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergometine, epinephrine and menadione. *Pharmacol.exptl.Therap.* 82: p. 292.
- KONING, J. de (1975): Diagnostische en therapeutische aspecten van idiopathische trombocytopenie. Proefschrift, Leiden.
- KONTRAS, S.B. et al. (1963): Giant hemangioma with thrombocytopenia. *Amer.J.Dis.Child.* 105: p. 188.
- KOOL, M.J. (1974): Vruchtwater -stolsel-embolie en vruchtwaterinfusie. Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- KLOOSTERMAN, G.J. (1970): On intrauterine growth. *Int.J.Gynaec.Obstet.* 8: p. 895.
- KUNZ, S., BRIEL, R.C., KUNZ, E.E., SCHLOTTER, C. (1975): Platelet aggregation, adhesivity, spreading capacity in normal pregnancy and E.P.H.-gestosis. *Suppl. I.R.C.S. Medical Sci.* 3 (9): p. 26.
- LANGE, R.D., DYNESIUS, R. (1973): Blood volume changes during normal pregnancy. *Clin.Haematol.* 2, 3: p. 433.

- LENTINI, D., BOLOGNA, E. (1974): Hypertension and platelet aggregation. In: Platelet Aggregation and Drugs, p. 63. Editors: Caprino en Rossi, Acad.Press.
- LEVY, G., GARRETTSON, L.K. (1974): Kinetics of salicylate elimination by newborn infants of mothers who ingested aspirin before delivery. *Pediatrics*, 53: p. 201.
- LIM, H.T. (1972): Vruchtwater embolie. Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- LINDSAY, R.M., KOENS, F., LINTON, A.L. (1975): An evaluation of the Coulter thrombocounter in counting platelets before and after contact with foreign surfaces and its use in tests of platelet retention. *J.Lab.clin.Med.* 86: p. 863.
- MAAT, C.E.M. de (1969): De biologische halveringstijd van met Cr⁵¹ gemerkte bloedplaatjes. Proefschrift, Utrecht.
- MACA, R.D., FRY, G.L., HOAK, J.C. (1972): New method for detection and quantitation of circulating platelet aggregates. *Microvasc. Res.* 4: p. 453.
- MAJERUS, P.W. (1976): Why Aspirin? *Circulation*, 54: p. 357.
- MALMSTEN, C., HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSON, B. (1975): Physiological role of an endoperoxide in human platelets: hemostatic defect due to platelet cyclo-oxygenase deficiency. *Proc.nat.Acad.Sci., Wash.* 72: p. 1446.
- MARCUS, A.J. (1969): Platelet function, *New.Eng.J.Med.* 280: part I, p. 1213, part II, p. 1278, part III, p. 1330.
- MARTIN, C.B., RAMSEY, E.M. (1970): Gross anatomy of the placenta of rhesus monkeys. *Obstet.Gynecol.* 36: p. 167.
- McKAY, D.G., HERTIG, A.T., ADAMS, E.C., RICHARDSON, M.V. (1958): Histochemical observations on the human placenta. *Obstet.Gynec.* 12: p.1.
- McKAY, D.G., BERGHER DE BACALAO, E., SEDLIS, A. (1964): Platelet adhesiveness in toxemia of pregnancy. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 90: p. 1315.
- McKAY, D.G. (1972): Hematologic evidence of disseminated intravascular coagulation in eclampsia. *Obstet.gynec.Surv.* 29: p. 399.
- McKAY, D.G. (1973): Intravascular coagulation -acute and chronic-disseminated and local. In: *Coagulation, current research and clinical application*, p. 45. Editors: Schmer and Strandford, Academic Press, New York.
- McKAY, D.G. (1974): The clinical spectrum and management of acquired coagulopathy in pregnancy. In: *Controversy in Obstetrics and Gynecology, II*, p. 283. Editors: Reid, D.E. en Christian, C.D., Publ. W.B. Saunders Co.
- MIELKE, Jr. C.H. et al. (1969): The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. *Blood*, 34: p. 204.
- MIRD (1975): Absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and organs. MIRD Pamphlet 11, New York, Society of Nuclear Medicine Inc.
- MØE, N., JØRGENSEN, L. (1968): Fibrin deposits on the syncytium of the normal human placenta: evidence of their thrombogenic origin. *Acta path.microbiol. scand.* 72: p. 519.

- MOLL, W., KÜNZEL, W. (1973): The blood pressure in arteries entering the placentae of guinea pigs, rats, rabbits and sheep. *Pflügers Arch.* 338: p. 125.
- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S., VANE, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263: p. 663.
- MUSTARD, J.F., PACKHAM, M.A. (1970): Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation. *Pharmacol.Rev.* 22: p. 98.
- MYATT, L., ELDER, M.G. (1975): The effects on platelet aggregation of oral prostaglandin E₂ used for the induction of labour. *Brit.J.Obstet.Gynaec.* 82, p. 449.
- O'BRIEN, J.R. (1962): Platelet aggregation I: Some effects of the adenosine phosphates, thrombin and cocaine upon platelet adhesiveness. *J.clin. Path.* 15: p. 446.
- O'BRIEN, J.R. (1968): Effects of salicylates on human platelets. *Lancet*, 1, p. 779.
- OKUMA, M., STEINER, M., BALDINI, M. (1969): Lipid peroxidation in aging platelets. *Blood*, p. 34: p. 712.
- OKUMA, M., STEINER, M., BALDINI, M. (1970): Studies on lipid peroxides in platelets. I. Method of assay and effect of storage. *J.Lab.clin.Med.* 75: p. 283.
- OKUMA, M., STEINER, M., BALDINI, M. (1971): Studies on lipid peroxides in platelets. II. Effect of aggregating agents and platelet antibody. *J. Lab.clin.Med.* 77: p. 728.
- O'REILLY, R.A. (1973): Problems of haemorrhage and thrombosis in pregnancy. *Clin.Haematol.* 2: p. 543.
- PAINTIN, D.B. et al. (1966): Iron and hemoglobin level in pregnancy. *J.obstet.Gynaec.brit.Cwlth.* 73: p. 181.
- PEDERSON, H.J., TEBO, T.H., JOHNSON, S.A. (1967): Evidence of hemolysis in the initiation of hemostasis. *Amer.J.clin.Path.* 48: p. 62.
- PITKIN, R.M., REYNOLDS, W.A. (1975): Creatinine exchange between mother, fetus and amniotic fluid. *Amer.J.Physiol.* 228: p. 231.
- PLACER, Z.A., CUSHMAN, L.L., JOHNSON, B.C. (1966): Estimation of product of lipid peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in biochemical systems. *Ann. Biochem.* 16: p. 359.
- PRITCHARD, J.A., CUNNINGHAM, F.G., MASON, R.A. (1976): Coagulation changes in eclampsia: their frequency and pathogenesis. *Amer.J. Obstet.Gynec.* 124: p. 855.
- RAMSEY, E.M., HARRIS, J.W. (1966): Comparison of uteroplacental vasculature and circulation in the rhesus monkey and man. *Contrib.Embryol.Carneg.Inst. (Washington)*, 38: p. 59.
- REID, D.E., FRIGOLETTO, F.D., TULLIS, J.L., HINMAN, J. (1971): Hypercoagulable states in pregnancy. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 111: p. 493.
- REYNOLDS, S.R.M., PAUL, W.N., HUGGET, A.St.G. (1954): Physiological study of monkey fetus in utero: procedure for blood pressure recording, blood sampling and injection of fetus under normal conditions. *Bull.Johns Hopkins Hosp.* 95: p. 256.

- ROACH, M.R. (1963): An experimental study of the production and time course of poststenotic dilatation in the femoral and carotid arteries of adult dogs. *Circulat.Res.* 13: p. 537.
- ROBERTSON, W.B., BROSENS, I., DIXON, H.G. (1967): The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J.Path. Bact.* 93: p. 581.
- ROBERTSON, W.B., BROSENS, I., DIXON, H.G. (1975): Uteroplacental vascular pathology. *Europ.J.Obst.Gyn.Reprod.Biol.* 5: p. 47.
- ROTH, G.J., MAJERUS, P.W. (1975): The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulare fraction protein. *J.clin. Invest.* 56: p. 624.
- ROYEN, E.A. van (1974): Haemostasis in human pregnancy and delivery. Proefschrift, Gemeente Universiteit, Amsterdam.
- ROYEN, E.A. van, CATE, J.W. ten (1976): Generation of a thrombin-like activity in late pregnancy. *Thromb.Res.* 8: p. 487.
- SALZMAN, E.W. (1972): Cyclic AMP and platelet function. *New Engl.J. Med.* 286: p. 358.
- SCHWARTZ, A.D. (1974): A method for demonstrating shortened platelet survival utilizing recovery from aspirin effect. *J.Pediat.* 84: p. 350.
- SHAPER, A.G., KEAR, J., MacINTOSH, D.M., KYOBE, J., NJAMA, D. (1968): The platelet count, platelet adhesiveness and aggregation and the mechanisms of fibrinolytic inhibition in pregnancy and the puerperium. *J.Obstet.Gynaec. brit.Cwlth.* 75: p. 433.
- SHAPIRO, S. et al. (1976): Perinatal mortality and birth-weight in relation to aspirin taken during pregnancy. *Lancet*, 1: p. 1375.
- SEEDS, A.E., KOCK, H.C., MYERS, R.E., STOLTE, L.A.M., HELLEGERS, A.E. (1967): Changes in amniotic fluid pH, pCO₂, and bicarbonate concentration following maternal and fetal hypercarbia and fetal death in utero. *Amer.J.Obstet. Gynec.* 97: p. 67.
- SEJENY, S.A., EASTHAM, R.D., BAKER, S.R. (1975): Platelet counts during normal pregnancy. *J.clin.Path.* 28: p. 812.
- SINGER, R. (1945): Acetylsalicylic acid, a probable cause for secondary post-tonsillectomy hemorrhage. *Arch.Otolaryng.* 42: p. 19.
- SIXMA, J.J. (1972): Methods for platelet aggregation. *Adv.exp.med.Biol.* 34: p. 79.
- SLONE, D. et al. (1976): Aspirin and congenital malformations. *Lancet* 1: p. 1373.
- SMITH, J.B., WILLIS, A.L. (1971): Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature (New Biol.)* 231: p. 235.
- SMITH, J.B., INGERMAN, C.M., SILVER, M.J. (1976): Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *J.Lab. clin.Med.* 88: p. 167.
- SOLLIS, R.T., WRIGHT, C.B., GIBBO, M.B. (1973): A model for quantitating in vivo platelet aggregating. *Bibliotheca Anatomica*, 12: p. 223.
- STONE, M.L., PILLIERO, S.J., HAMMER, H., PORTNOY, A. (1960): Epinephrine and norepinephrine in pregnancy. *Obstet.Gynec.* 16: p. 674.
- STUART, M.J., STOCKMAN, J.A., OSKI, F.A. (1974): Acetylsalicylic acid (aspirin) inhibits platelet lipid peroxidation. *Suppl. I.R.C.S. Medical Sci.* 2: p. 1384.

- STUART, M.J., SCOTT MURPHY, B.S., OSKI, F.A. (1975): A simple nonradioisotope technic for the determination of platelet life-span. *New Engl.J.Med.* 292: p. 1310.
- SWANK, R.L. (1968): The screen filtration pressure method in platelet research significance and interpretation. *Ser.Haemat.* 1: p. 146.
- SWANK, R.L., ROTH, J.G., JANSEN, J. (1964): Screen filtration pressure method and adhesiveness and aggregation of blood cells. *J.appl. Physiol.* 19: p. 340.
- TERRAGNO, N.A., TERRAGNO, D.A., PACHOLCZYK, D., MacGIFF, J.C. (1974): Prostaglandines and the regulation of uterine blood flow in pregnancy. *Nature*, 249: p. 57.
- TODD, M.E. et al. (1965): Changes in blood coagulation during pregnancy. *Mayo Clin.Proc.* 40: p. 370.
- TRUDINGER, B.J. (1976): Platelets and intrauterine growth retardation in preeclampsia. *Brit.J.Obstet.Gynaec.* 83: p. 284.
- TS'AO, C.H., GREEN, D., SCHULZ, K. (1976): Function and ultrastructure of platelets of neonates. Enhanced ristocetin aggregation of neonatal platelets. *Brit.J.Haemat.* 32: p. 225.
- VAN, S., MAECK, J., ZILLIACUS, H. (1948): Heparin in the treatment of toxemia of pregnancy. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 55: p. 316.
- VANE, J.R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (New Biol.)* 231: p. 232.
- VENUTO, R.C., O'DORISIO, T., STEIN, J.H., FERRIS, T.F. (1975): Uterine prostaglandin E secretion and uterine blood flow in the pregnant rabbit. *J.clin.Invest.* 55: p. 193.
- VREEKEN, J., AKENE, W.G. van (1971): Spontaneous aggregation of blood platelets as a cause of idiopathic thrombosis and recurrent painful toes and fingers. *Lancet*, II: p. 1394.
- WALLENBURG, H.C.S. (1968): De gelokaliseerde placentalaesies. *Ned.T. Geneesk.* 112: p. 2357.
- WALLENBURG, H.C.S. (1969): Über den Zusammenhang zwischen Spätgestose und Plazentainfarkt. *Arch.Gynäk.* 208: p. 80.
- WALLENBURG, H.C.S. (1971): On the Morphology and Pathogenesis of Placental Infarcts. *Proefschrift, Vrije Universiteit, Amsterdam.*
- WALLENBURG, H.C.S., STOLTE, L.A.M., JANSSENS, J. (1973a): The pathogenesis of placental infarction. I. A morphologic study in the human placenta. *Amer.J.Obstet.Gynec.* 116: p. 835.
- WALLENBURG, H.C.S., HUTCHINSON, D.L., SCHULER, H.M., STOLTE, L.A.M., JANSSENS, J. (1973b): The pathogenesis of placental infarction. II. An experimental study in the rhesus monkey placenta. *Amer.J. Obstet.Gynec.* 116: p. 841.
- WALLENBURG, H.C.S. (1975). Störungen der materalen Plazentadurchblutung. *Arch.Gynäk.* 219: p. 349.
- WEISS, H.J., ALEDORT, L.M., KOCHWA, S. (1968): The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man. *J.clin.Invest.* 47: p. 2169.
- WEISS, H.J. (1975): Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New.Eng.J.Med.* 293: part I: p. 531, part II: p. 580.
- WEISS, H.J. (1976): Platelet function tests and their interpretation. *J.Lab.clin.Med.* 87: p. 909.

- WILKIN, P. (1965): Pathologie du Placenta. Masson et Cie., Parijs.
- WLADIMIROFF, J.W., BLOEMSMA, C.A., WALLENBURG, H.C.S. (1977): Ultrasonic assessment of fetal growth. Acta obstet.gynec.Scand. (in druk).
- WOLF, F. de , WOLF-PEETERS, C. de, BROSENS, I. (1973): Ultrastructure of the spiral arteries in the human placental bed at the end of normal pregnancy. Amer.J.Obstet.Gynec. 117: p. 833.
- WU, K.K., HOAK, J.C. (1974): New method for quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. Lancet, II: p. 924.
- WU, K.K., HOAK, J.C. (1976): Spontaneous platelet aggregation in arterial insufficiency mechanisms and implications. Thromb. Haemostas. (Stuttg.) 35: p. 702.
- ZUCKER, M.B. (1974): Effect of heparin on platelet function. Thromb. Diath.Haemorrh. (Stuttg.) 33: p. 63.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 24 oktober 1939 te Djakarta geboren. Hij behaalde in 1959 het eindexamen HBS-B aan het Constantijn College te Amersfoort. Nadat hij in 1964 het doctoraalexamen Geneeskunde had afgelegd aan de Rijksuniversiteit Utrecht, volgde hij zijn co-assistentenschappen aan de Stichting Klinisch Hoger Onderwijs te Rotterdam. In 1967 werd hij bevorderd tot arts. Vanaf april 1968 tot september 1970 was hij als algemeen arts werkzaam in het Nangina Hospital in Kenya (Oost Afrika). Op 1 november 1970 ving hij zijn opleiding tot vrouwenarts aan op de afdeling Obstetrie en Gynaecologie (Hoofd: destijds Prof.Dr.A.L.C.Schmidt; heden Prof.Dr.A.C.Drogendijk jr.) van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt en werd in november 1975 in het Specialisten Register ingeschreven. Tot december 1976 was hij als gynaecoloog verbonden aan de afdeling Obstetrie en Gynaecologie van het AZR-Dijkzigt. Per 1 maart 1977 is hij in dienst getreden van het Likuni Hospital te Malawi (Afrika) en zal daar als vrouwenarts werkzaam zijn in het kader van de Nederlandse Ontwikkelings-samenwerking.

Omslag: Scanning electronen microscopische foto van beginnende thrombus (Unilever Research Vlaardingen).