

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
- Rezumat -

Conducător de doctorat

Prof.univ.dr. ION ILEANA

Student-doctorand

BÂTCĂ (ONICEANU) E. FLORINA-MĂDĂLINA

CONSTANȚA, 2016

Particularități ale hemostazei în evoluția sindroamelor hemoragice la copii

Cuvinte cheie: hemostaza, copii, trombelastografie, microscopie electronică

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

CAPITOLUL I – Hemostaza fiziologică.....	8
1.1 Scurt istoric.....	8
1.2 Timpul vascular al hemostazei.....	9
1.3 Timpul trombocitar al hemostazei.....	10
1.4 Coagularea sângelui.....	15
1.5 Bibliografie.....	22
 CAPITOLUL II – Particularități ale hemostazei la nou-născut și copil.....	 24
2.1 Hemostaza “în curs de dezvoltare”.....	24
2.2 Dileme legate de interpretarea parametrilor hemostatici la copii.....	27
2.3 Bibliografie.....	31
 CAPITOLUL III – Aspecte clinice ale tulburărilor hemostazei la copii.....	 34
3.1 Sindroamele hemoragipare.....	34
3.1.1 Anomalii ale peretelui vascular.....	34
3.1.1.1 Malformații ereditare ale peretelui vascular.....	34
3.1.1.2 Anomalii ereditare ale țesutului conjunctiv.....	35
3.1.1.3 Anomalii câștigate ale peretelui vascular.....	35
3.1.2 Boli hemoragice de origine trombocitară.....	36
3.1.2.1 Anomalii cantitative ale trombocitelor.....	36
3.1.2.2 Anomaliile calitative ale trombocitelor.....	38
3.1.3 Anomalii ale factorilor implicați în coagulare.....	40
3.2 Trombozele vasculare.....	42
3.2.1 Etiopatogenia trombozelor vasculare la copii.....	42
3.2.2 Studiul manifestărilor trombotice la vârsta pediatrică.....	43
3.2.3 Oportunitatea testării pentru trombofilie.....	43
3.3 Bibliografie.....	45

CAPITOLUL IV – Metode de evaluare a tulburărilor hemostazei.....	48
4.1 Introducere.....	48
4.2 Variabile preanalitice.....	48
4.3 Teste uzuale pentru evaluarea hemostazei.....	50
4.3.1 Numărătoarea de trombocite.....	50
4.3.2 Timpul de sângerare.....	50
4.3.3 Timpul de protrombină.....	51
4.3.4 International Normalized Ratio.....	51
4.3.5 Timpul de tromboplastină parțial activată.....	51
4.3.6 Fibrinogenul.....	52
4.3.7 D-dimerii.....	52
4.4 Teste speciale.....	53
4.4.1. Teste speciale pentru evaluarea disfuncției trombocitare.....	53
4.4.1.1 Flowcitometria.....	53
4.4.1.2 Agregometria.....	54
4.4.1.3 Microscopia electronică.....	56
4.4.2 Trombelastografia.....	59
4.4.3 Teste de genetică moleculară.....	60
4.5 Bibliografie.....	62

PARTEA PERSONALĂ

CAPITOLUL V – Motivația alegerii temei de doctorat.....	69
--	-----------

CAPITOLUL VI – Obiectivele studiului.....	71
--	-----------

CAPITOLUL VII – Materiale și metode de studiu.....	72
---	-----------

7.1 Caracteristicile lotului de studiu.....	72
---	----

7.2 Metode de studiu pentru evaluarea statusului fluido-coagulant.....	72
--	----

7.2.1 Recoltarea și transportul probelor.....	72
---	----

7.2.2 Metode de studiu pentru evaluarea hemostazei utilizând teste convenționale.....	73
--	----

7.2.2.1 Numărătoarea de trombocite în cadrul hemoleucogramei.....	73
---	----

7.2.2.2	Frotiul de sânge periferic (FSP).....	74
7.2.2.3	Timpul de sângerare (TS).....	76
7.2.2.4	Timpul de protrombină (PT).....	77
7.2.2.5	Timpul de tromboplastină parțială activat (aPTT).....	78
7.2.2.6	Fibrinogenemia.....	78
7.2.2.7	D-dimeri.....	79
7.2.3	Trombelastografia (TEG).....	79
7.2.4	Profilul trombofilic.....	83
7.2.4.1	Materiale și metode necesare screeningului pentru trombofilie.....	83
7.2.4.2	Recomandări legate de testarea pentru trombofilie.....	85
7.2.4.3	Intervale de referință pentru profilul de trombofilie.....	85
7.2.4.4	Formular pentru testarea genetică.....	87
7.2.5	Studiul trombocitelor cu ajutorul microscopiei electronice.....	88
7.2.5.1	Prepararea probelor folosind tehnica whole mount.....	88
7.3	Metode de analiză statistică.....	91
7.4	Bibliografie	93
CAPITOLUL VIII – Rezultate și discuții.....		96
8.1	STUDIUL I – Stabilirea intervalelor de referință pentru parametrii trombelastografici la copii.....	96
8.1.1	Introducere.....	96
8.1.2	Material și metodă de lucru.....	96
8.1.2.1	Caracterizarea loturilor de studiu	96
8.1.2.2	Criterii de includere în studiu.....	97
8.1.2.3	Criterii de excludere din studiu.....	97
8.1.2.3	Metoda de studiu.....	97
8.1.3	Rezultate	99
8.1.4	Discuții	117
8.1.5	Bibliografie.....	122
8.2	STUDIUL II – Corelații între parametrii trombelastografici și testele uzuale de hemostază la copiii cu manifestări hemoragice.....	124
8.2.1	Introducere.....	124
8.2.2	Material și metode de lucru.....	124
8.2.3	Rezultate.....	125

8.2.4	Discuții.....	130
8.2.5	Bibliografie.....	132
8.3	STUDIUL III – Testarea profilului de trombofilie la copiii cu tromboze vasculare.....	133
8.3.1	Introducere.....	133
8.3.2	Material și metode de lucru.....	134
8.3.3	Rezultate.....	135
8.3.4	Discuții.....	141
8.3.5	Bibliografie.....	145
8.4	STUDIUL IV – Evidențierea detaliilor de ultrastructură trombocitară la pacienții cu purpură trombocitopenică cu ajutorul microscopiei electronice.....	147
8.4.1	Introducere.....	147
8.4.2	Material și metodă de lucru.....	147
8.4.3	Rezultate.....	149
8.4.4	Discuții.....	166
8.4.5	Bibliografie.....	169
CAPITOLUL IX – Concluzii.....		170
BIBLIOGRAFIE.....		173

1. INTRODUCERE

Hemostaza este un proces dinamic ce începe în utero și evoluează gradual într-o structură matură și definitivă (1).

Sistemul hemostatic al nou-născutului și copilului mic este diferit de cel al copilului mare și al adultului. Oricum, dincolo de aceste diferențe, nou-născuții și copiii mici sănătoși au o hemostază excelentă (2).

Diverse studii au demonstrat că diferențele dintre factorii de coagulare la nou-născut și adult nu sunt de ordin calitativ, ci cantitativ (3). De aceea se desprinde ideea că, de-a lungul întregii copilării, componentele sistemului hemostatic evoluează spre caracteristicile hemostazei adulte.

Utilizarea echipamentelor moderne, cu nivel înalt de încredere, și măsuri de asigurare a calității vor duce la cât mai puține erori în cazul testării hemostazei. Oricum, sunt raportate numeroase rezultate incorecte, de multe ori datorită unor evenimente independente de laboratorul care efectuează testarea. Acest lucru este în principal rezultatul variabilelor preanalitice legate de elaborarea și interpretarea rezultatelor (3).

2. MOTIVAȚIA ALEGERII TEMEI DE DOCTORAT

La vârsta pediatrică, afecțiunile hemoragice și trombozele vasculare reprezintă o sursă semnificativă de morbiditate și mortalitate. Poate nu incidența acestor afecțiuni este cea care impresionează, dar sigur morbiditățile, care pot fi invalidante și pot afecta în întregime viața copiilor și a familiilor acestora.

Bazate pe experiența adulților, terapiile destinate copiilor trebuie diferențiate și adaptate situației particulare oferite de această vârstă evolutivă a diferențierii și maturării, care împrumută aceste caracteristici inclusiv procesului de hemostază.

Boala trombotică sau hemoragică la copil va fi mereu o sursă de neprevăzut, un element-surpriză cu conotații negative pe care medicul specialist pediatru cu competență în oncohematologie pediatrică trebuie să o gestioneze conform unei conduite încă nestandardizate în România.

Investigațiile paraclinice efectuate pentru stabilirea tipului de boală necesită mereu investiții pe plan financiar. Nu numai aparatura trebuie să fie la cele mai înalte standarde, bine calibrată și mereu performantă, dar și personalul care manipulează și care interpretează rezultatele trebuie să beneficieze de o pregătire corespunzătoare.

Însumând aceste date și având o minimă experiență în investigarea și tratarea copiilor cu boli hemato-oncologice, am decis implicarea mea în studiul afecțiunilor trombotice și hemoragice la această vârstă.

3. SCOPUL STUDIULUI

Scopul acestui studiu este identificarea metodelor de laborator necesare și perfect realizabile pentru investigarea pacienților pediatrici cu manifestări hemoragice și tromboze vasculare. De asemenea, ne propunem detalierea unor investigații speciale extrem de rar utilizate în studiul afecțiunilor pediatrice, și anume trombelastografia și cercetarea morfologiei trombocitare cu ajutorul microscopului electronic.

4. MATERIALE ȘI METODE DE STUDIU

4.1 Caracteristicile loturilor de studiu

Studiul s-a desfășurat în perioada 2009-2013 și a inclus 90 de copii: 50 dintre ei au fost diagnosticați cu diverse manifestări hemoragice sau tromboze vasculare în cadrul Departamentului de Oncohematologie Pediatrică din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență “Sfântul Apostol Andrei” Constanța. Restul de 40 de copii au fost incluși în lotul martor, format din copii consultați în aceeași perioadă în Clinica de Pediatrie, Ambulatoriul de Pediatrie și Oncohematologie pediatrică, serviciul de Chirurgie Pediatrică și au fost declarați clinic sănătoși.

Copiii au fost împărțiți în trei loturi:

- lotul H (hemoragie), format din 40 de copii cu manifestări hemoragice;
- lotul T (tromboză), format din 10 copii cu manifestări trombotice;
- lotul M (martor), format din 40 de copii fără tulburări de hemostază, declarați clinic sănătoși.

De asemenea, în studiu au intrat 30 de voluntari adulți fără semne de boală sistemică, care au negat consumul de medicație antiagregantă sau anticoagulantă care să influențeze testele convenționale de hemostază.

Studiul propriu-zis este divizat în patru cercetări care evaluează diverse aspecte ale metodelor de laborator aplicate în patologia amintită.

Studiul I își propune stabilirea intervalelor de referință pentru parametrii trombelastografici la copii. Astfel, vor fi comparate valorile obținute la copiii fără tulburări ale hemostazei cu valorile de referință bine stabilite ale adulților sănătoși; de asemenea, ne propunem evidențierea posibilelor diferențe legate de vârstă pentru această determinare.

Tuturor pacienților incluși în studiu li s-a recoltat sânge venos conform protocolului descris în Capitolul VII în vederea efectuării hemoleucogramei (pentru excluderea trombocitopeniei) și a trombelastografiei.

Trombelastogramele au fost realizate cu ajutorul unui trombelastograf cu două canale de măsurare, care permite vizualizarea curbei trombelastografice înscrisă pe hârtie termosensibilă, dar și pe monitorul calculatorului.

Probele de sânge au fost obținute în urma plasării unui cateter cu fluturaș cu ac de 19-21 G, în vacutainere cu anticoagulant citrat de sodiu 3.2%. Primii 2-3 ml de sânge recoltat nu se utilizează pentru testare.

Pentru realizarea TEG, din proba recoltată se aspiră 330 μ l sânge, care se poziționează într-o cuvă de plastic cu colier metalic, deja încălzită la 37°C, peste care se adaugă clorură de calciu 0.2M, 30 μ l. În cuvă se introduce un pin de măsurare atașat la un cablu de torsiune calibrat, cheagul de fibrină formându-se între pin și cuvă. Peste probă se adaugă un strat de ulei de parafină pentru a împiedica evaporarea. În timpul formării cheagului, se imprimă o mișcare de rotație pinului ce se va înregistra grafic pe hârtie impresionată termic, dar și pe monitorul calculatorului.

Se înregistrează parametrii trombelastografici: R, K, unghiul alfa și MA (amplitudinea maximă) și se calculează indexul de coagulare.

Studiul II evaluează posibilele corelații existente între parametrii trombelastografici și testele uzuale de hemostază la copiii cu manifestări hemoragice.

Obiectiv principal - Evaluarea relației dintre parametri TEG și testele uzuale de coagulare la copiii cu hemoragii prin PTI.

Obiective secundare - Ne propunem să stabilim utilitatea TEG în aprecierea riscului de hemoragie la pacienții cu PTI și dacă această determinare, prin timpul scurt de realizare și prin complexitatea informațiilor oferite, poate fi promovată în evaluarea de rutină a sindroamelor hemoragice la copii.

Caracterizarea lotului de studiu.

În studiu au fost incluși 40 de copii cu manifestări hemoragice cutaneo-mucoase, hematurie, metroragie, având diagnosticul de purpură trombocitopenică idiopatică sau imunologică.

Criterii de includere – prezența de manifestări hemoragice cutaneo-mucoase sau valori ale trombocitelor sub 150.000/mm³.

Pacienții incluși în lotul H (hemoragii) au fost investigați conform protocoalelor exemplificate în capitolul VII pentru a stabili riscul hemoragic și pentru a alege soluția terapeutică optimă în timpul cel mai scurt. În acest sens, s-a recoltat sânge venos pentru a determina testele uzuale de hemostază (numărul de trombocite, VTM, TS, PT, aPTT, INR) și pentru trombelastografie.

Studiul III explorează testarea profilului de trombofilie la copiii cu tromboze vasculare. Lotul de studiu, pe care l-am numit lotul T, este format din 10 copii care au fost diagnosticați cu manifestări trombotice arteriale sau venoase, pentru care investigațiile pentru stabilirea etiologiei afecțiunii acute s-au efectuat în afara terapiei anticoagulante.

Pentru acești pacienți, s-au respectat condițiile de recoltare menționate în Capitolul VII, iar sângele a fost analizat în cadrul laboratoarelor Synevo Germania.

Pentru evaluarea statusului hemostazei, ne-am propus inițial testarea hemostazei primare și secundare utilizând teste convenționale de hemostază: numărul de trombocite, volumul trombocitar mediu (VTM), lărgimea distribuției trombocitare (LDT), timpul Quick, timpul de tromboplastină parțial activat (aPTT), INR, calciul seric, calciul ionic, nivelul fibrinogenului.

Pentru a stabili dacă manifestarea trombotică se datorează unei trombofilii ereditare, s-au determinat următoarele analize:

- Mutația factorului V Leiden
- Mutația genei protrombinei
- Activitatea Proteinei C și a Proteinei S
- Antitrombina
- Mutațiile genei MTHFR și homocisteinemia.

Studiul IV reprezintă o cercetare a morfologiei trombocitare cu ajutorul microscopiei electronice la pacienții cu purpură trombocitopenică idiopatică.

Sângele a fost recoltat de la 40 pacienți sănătoși și de la 40 pacienți cu trombocitopenie și macrotrombocite conform protocolului detaliat în Capitolul VII.

Grilele pregătite în prealabil cu Formvar au fost acoperite cu plasmă bogată în trombocite, apoi au fost spălate și lăsate să se usuce pentru examinarea cu ajutorul microscopului electronic.

Pentru fiecare probă obținută s-au realizat următoarele determinări:

- Măsurarea diametrului lung al trombocitelor, atât pentru stabilirea tipului celular (dimensiunea trombocitului variază între 2-4 μ), cât și pentru identificarea macrotrombocitelor (diametrul peste 6 μ).
- Identificarea și numărarea granulelor dense pentru 50-100 de trombocite/pacient, raportându-se numărul mediu de granule dense/trombocit. Numărul obținut a fost comparat cu intervalele considerate normale din literatura de specialitate (4-8 granule dense/trombocit).
- Măsurarea dimensiunilor granulelor dense.

- Evidențierea diverselor tipuri morfologice ale granulelor dense:
 - tipul clasic, de formă rotundă, bine delimitat
 - cu coadă (whip-like)
 - forme complexe
- Evidențierea structurilor electron-dense inelare, a lanțurilor și aglomerărilor sub formă de ciorchine (cluster), care par a reprezenta depozite de calciu la nivelul sistemului tubular dens.
- Evidențierea granulelor α .

5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

STUDIUL I - Stabilirea intervalului de referință pentru parametrii trombelastografici la copii

Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabele, sub formă de valori medii ale parametrilor studiați, și sub formă de grafice.

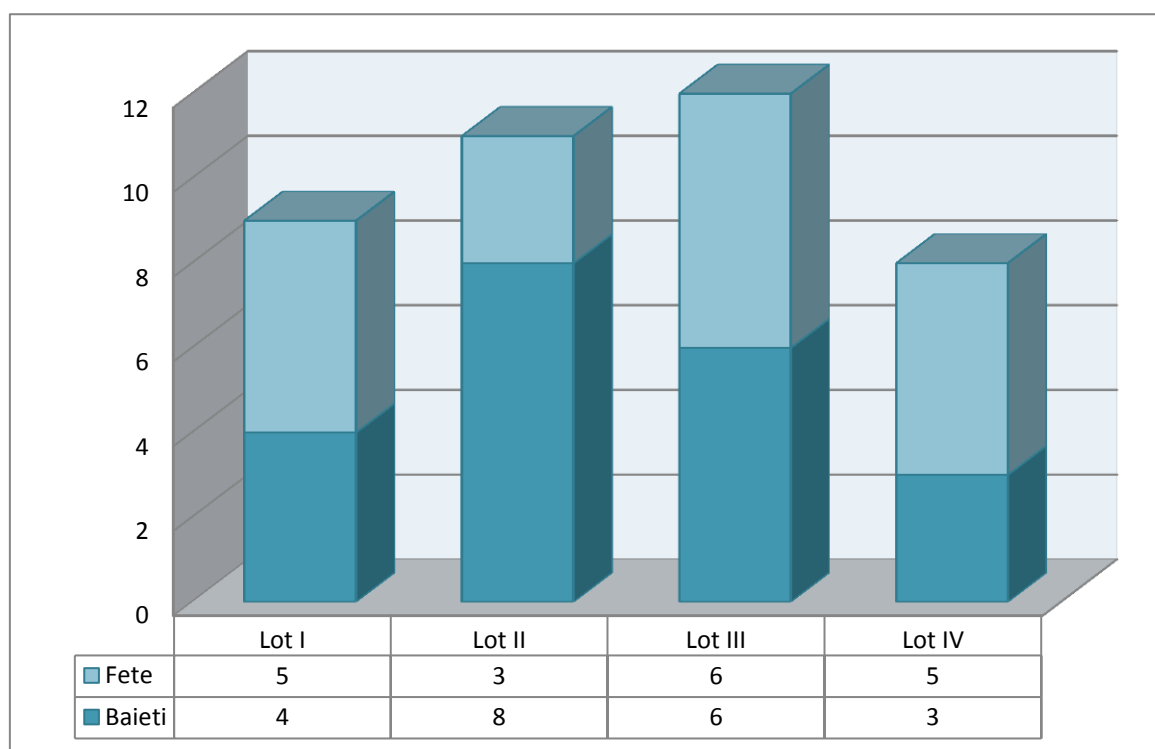


Fig.12 Repartiția pe grupe de vârstă a pacienților incluși în studiu

În fig.12 sunt reprezentate loturile de copii sănătoși pe grupe de vârstă și sex.

În tabelul XII sunt reprezentate valorile medii ale parametrilor trombelastografici obținuți pentru pacienții pediatrici sănătoși, împreună cu deviațiile standard.

Tabel XII Valorile medii ale parametrilor trombelastografici pentru cele patru loturi și deviația standard.

Parametru	R (mm)	K (mm)	Alfa (grade)	MA (mm)
Lot I	11.88 ±1.76	3.88±1.19	51.22±5.06	57.88±3.98
Lot II	12.27±2.02	4.13±1.05	50.81±8.9	58.45±6.13
Lot III	13.33±1.23	4.29±1.13	53.58±6.08	58.91±5.6
Lot IV	11±1.51	3.43±0.62	57.5±7.44	57.5±6.18

În tabelul XIII sunt menționate rezultatele trombelastogramelor realizate pentru pacienții lotului A, sub formă de valori medii și deviație standard.

Tabel XIII Valorile medii ale parametrilor trombelastografici pentru lotul A și deviația standard.

Parametru trombelastografic	R (mm)	K (mm)	Unghiul alfa	MA (mm)
Adulți (Lot A)	12.8±1.55	5.08±1.96	53.83±6.95	63.55±5.84

Următoarele patru grafice – fig. 13, fig.14, fig.15 și fig.17 arată distribuția valorilor parametrilor TEG pentru cele 5 loturi studiate raportate la intervalul de referință standard.

S-au notat valorile minime, respectiv maxime ale intervalelor standard folosind simbolul fiecărui parametru: Rmin, Rmax, Kmin, Kmax, MAmin, MA max, alfa min și alfa max, dar și valorile minime și maxime înregistrate în cadrul fiecărui lot în parte: min și max.

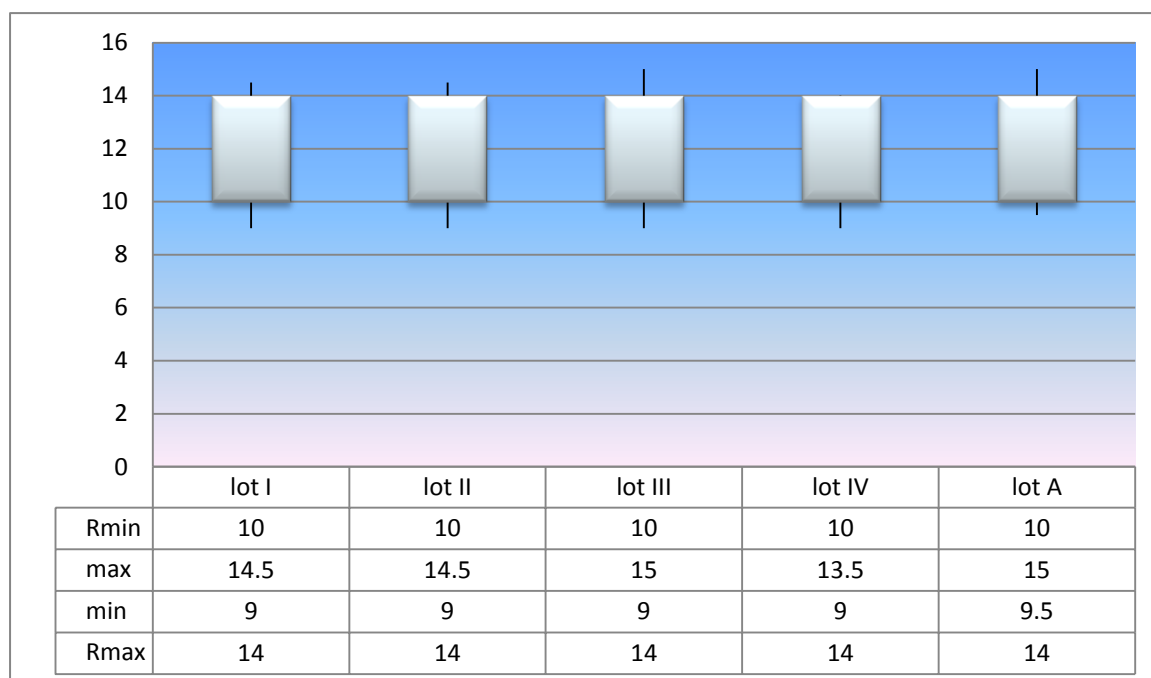


Fig.13 Reprezentarea grafică a valorilor parametrului R pentru pacienții studiați suprapuse peste intervalul standard corespunzător

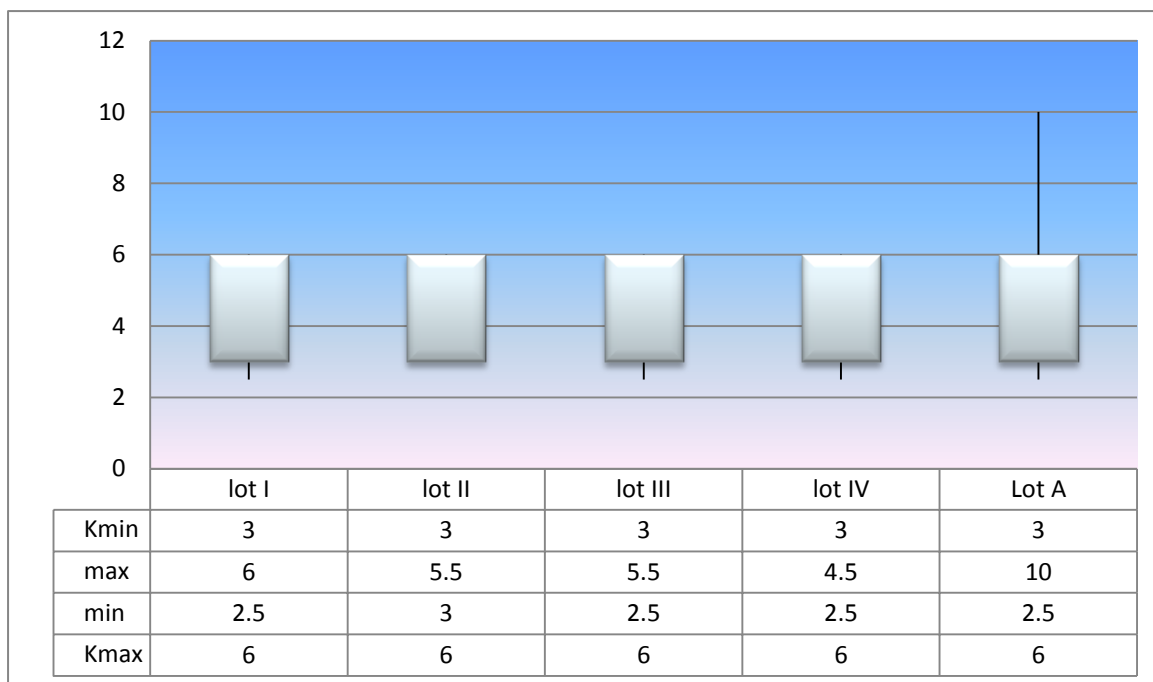


Fig.14 Reprezentarea grafică a valorilor parametrului K pentru pacienții studiați suprapuse peste intervalul standard corespunzător

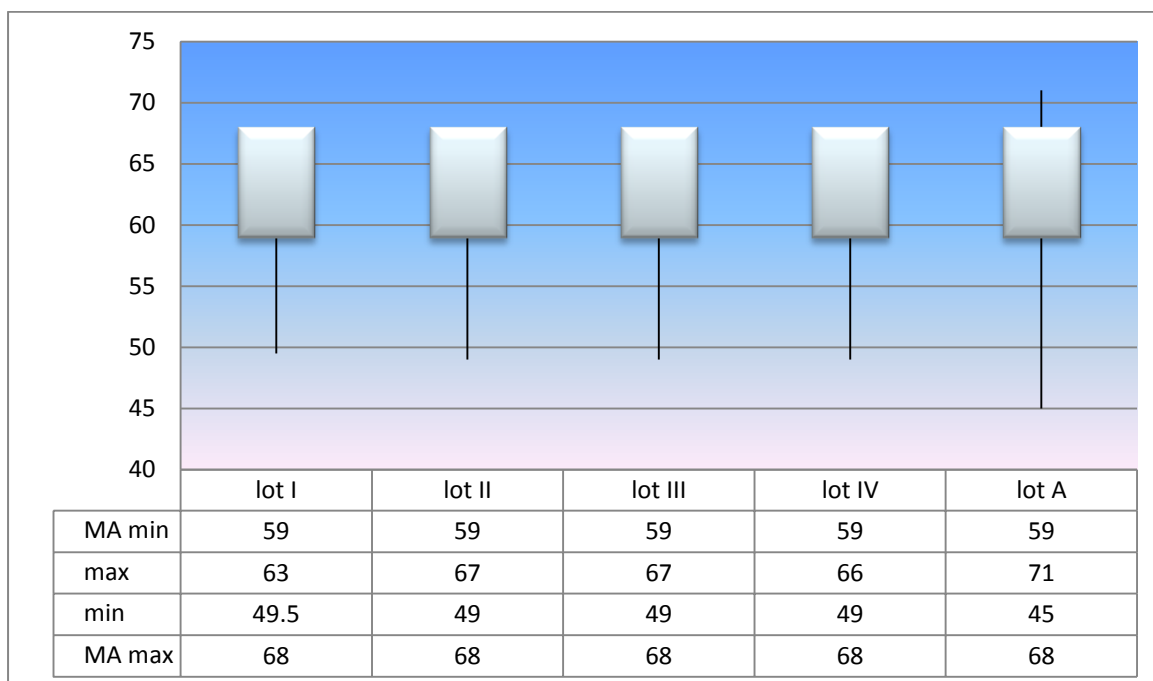


Fig.15 Reprezentarea grafică a valorilor parametrului MA pentru pacienții studiați suprapuse peste intervalul standard corespunzător

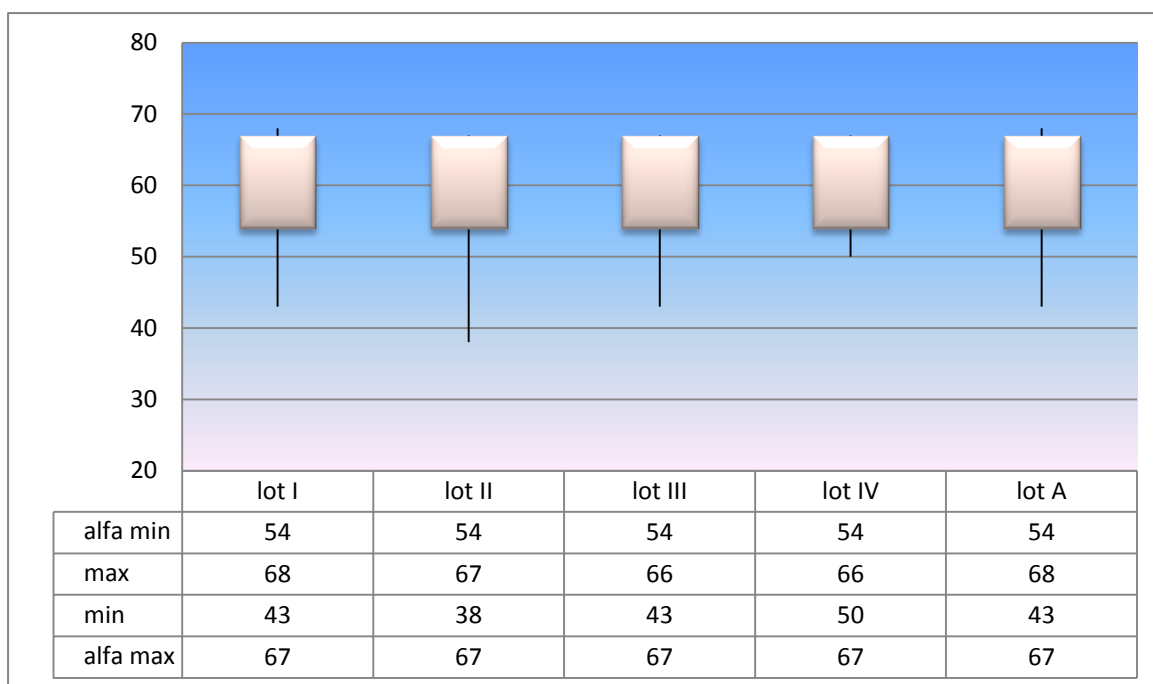


Fig.16 Reprezentarea grafică a valorilor parametrului alfa pentru pacienții studiați suprapuse peste intervalul standard corespunzător.

În urma efectuării TEG, am obținut valorile parametrului R care se încadrează în intervalul 9-14.5 mm. Parametrul K se va raporta la intervalul 2.5-6mm. Unghiul alpha va avea ca limite 38-67 grade, iar parametrul MA se va raporta la intervalul 45-71mm.

În cadrul lotului I, valoarea medie a parametrului R este mai scăzută comparativ cu valorile medii ale R din lotul A, ceea ce relevă un status mai coagulabil al celor mici printr-un timp de reacție mai rapid în inițierea formării cheagului. Aceeași relație se observă și pentru parametrul K, ceea ce demonstrează o accelerarea a formării cheagului la pacienții pediatrici din lotul I.

Când se compară valorile lui R pentru loturile III și IV, diferența este semnificativă statistic. În cazul lotului IV, valoarea parametrilor R și K scade sub valorile obținute pentru lotul I, adică sugerează un status mai coagulabil probabil datorită vârstei medii, de 15.3 ani care se apropie cel mai mult de vârsta adultă, dar și datorită predominanței sexului feminin în acest lot (62.5%).

Literatura de specialitate afirmă acest status mai coagulabil la nou-născuți și sugari bazat pe imaturitatea sistemului hemostatic, în plină dezvoltare la această vârstă. Nivelul unor proteine plasmatice precum antitrombina, dar și activitatea acestora sunt mult mai scăzute comparativ cu valorile de la vârsta adultă (10). Maturarea cantitativă a antitrombinei III are loc în primele șase luni de viață, similar cu progresia factorilor coagulării, care este de asemenea accelerată la această vârstă (11). În același timp, și rata eliminării unor factori ai

coagulării este crescută la această vârstă (12). Aceste date ne permit exprimarea ipotezei că statusul mai coagulabil al pacienților din lotul I se poate datora unui echilibru instabil între factorii care favorizează coagularea și proteinele care o inhibă.

Urmând recomandarea producătorului de a stabili propriile intervale de referință pentru parametrii trombelastografici, și alți autori au încercat să evalueze posibilele diferențe legate de vârstă, sex, etnie, grupa de sânge sau chiar temperatură.

Scarpelini și colaboratorii, într-un studiu din Canada, determină intervalele de referință pentru parametrii trombelastografici incluzând în cercetare 118 voluntari adulți sănătoși. Valorile obținute sunt apropiate de cele oferite în manualul de utilizare al TEG, însă pentru aproximativ 10% dintre subiecți s-a ridicat suspiciunea de coagulopatie, care a fost infirmată ulterior clinic și prin teste suplimentare. Femeile au prezentat un status mai coagulabil comparativ cu bărbații, iar creșterea în vârstă nu a fost asociată cu hipercoagulabilitatea (4).

Există un singur studiu care raportează intervale de referință pentru nou-născuți utilizând sânge recoltat din cordonul ombilical, însă se discută dacă aceste valori vor fi aplicabile și pentru nou-născuții în stare critică, cu risc crescut de coagulopatie (14).

În mai 2014, un alt studiu elaborat de Forman și colaboratorii la Universitatea de Medicină din Washington și-a propus studiul TEG la 24 de nou-născuți supuși hipotermiei și a demonstrat că cele mai influențabile variabile sunt K și unghiul alfa, ceea ce se traduce printr-o rată scăzută a cineticii formării cheagului, deci o activitate enzimatică scăzută și o stabilitate a cheagului mult mai mică (15).

Valorile medii ale unghiului alfa, care relevă cinetica formării cheagului, se apropie de valorile adultului în cazul loturilor III și IV, iar pentru loturile cu vârste mai mici se observă o accelerare a vitezei de formare a acestuia. Diferențele dintre loturi nu sunt semnificative statistic.

Rezistența cheagului este o informație importantă obținută în urma evaluării amplitudinii maxime MA. Acest parametru ajută la identificarea cauzei care a determinat manifestarea hemoragică – o coagulopatie sau o sângerare pur mecanică (16). Valoarea MA poate fi influențată de valoarea fibrinogenului, de numărul și stadiul funcțional al trombocitelor și de nivelul factorului XIII. Valori scăzute ale MA corespund disfuncțiilor plachetare sau hipofibrinogenemiei (17).

În studiul nostru, valorile medii ale MA obținute pentru toate cele patru loturi de copii se află sub valoarea minimă a intervalului de referință propus de producător.

STUDIUL II – Corelații între parametrii trombelastografici și testele uzuale de hemostază la copiii cu manifestări hemoragice

Rezultatele obținute în urma determinărilor au fost introduse în grafice și tabele, menționându-se media fiecărui parametru analizat și deviația standard. Stabilirea unei legături între valorile obținute a fost evaluată cu ajutorul coeficientului de corelație Pearson.

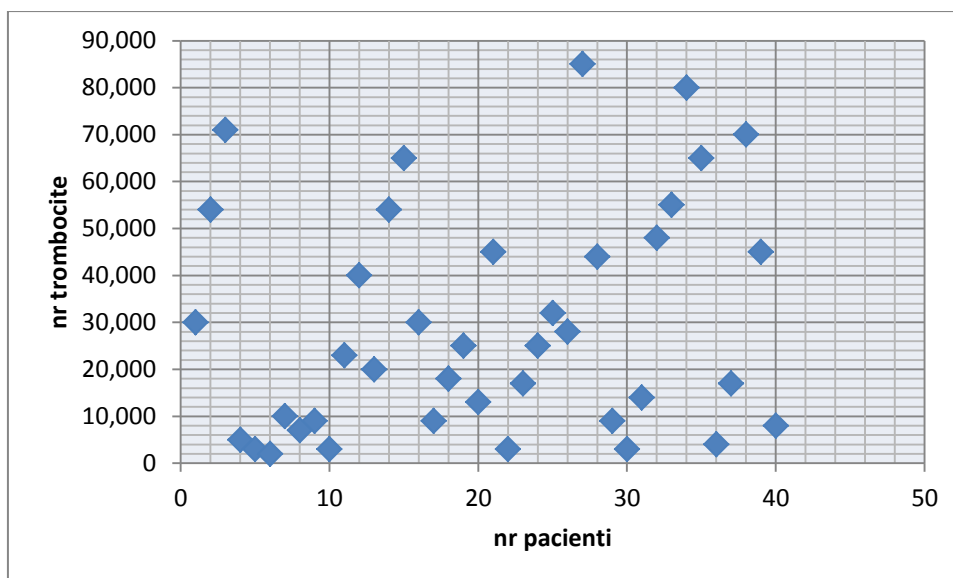


Fig.41 Distribuția numărului de trombocite la pacienții cu PTI

Valoarea medie a numărului de trombocite pentru pacienții cu trombocitopenie este de $29.700/\text{mm}^3$, ceea ce sugerează tendința spre sângerare spontană a acestor pacienți.

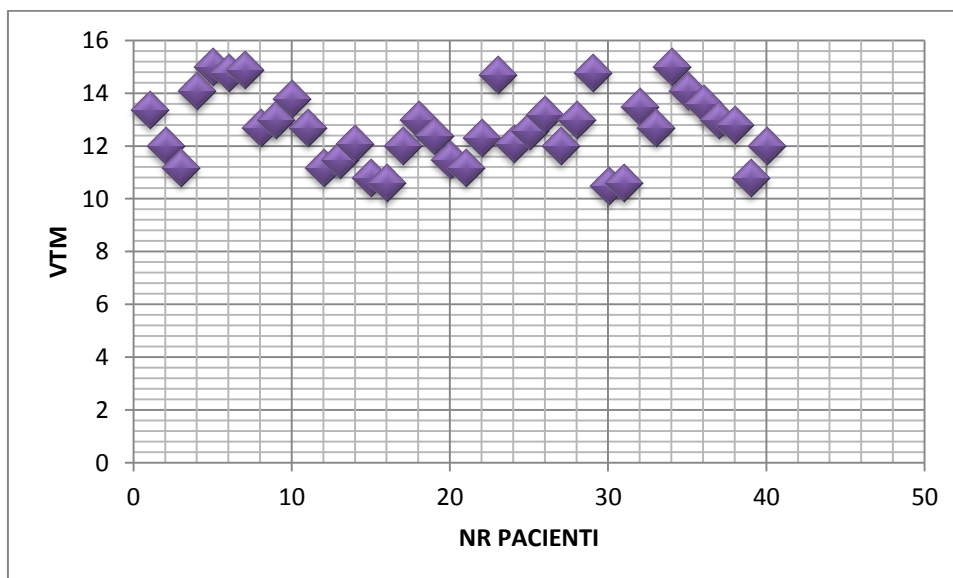


Fig.42 Valorile VTM la pacienții cu trombocitopenie

Valoarea medie a volumului trombocitar mediu este de 12.68 fl, aflându-se în limite normale. Ulterior, după reluarea producției trombocitare, VTM crește prin prezența în periferie a macrotrombocitelor.

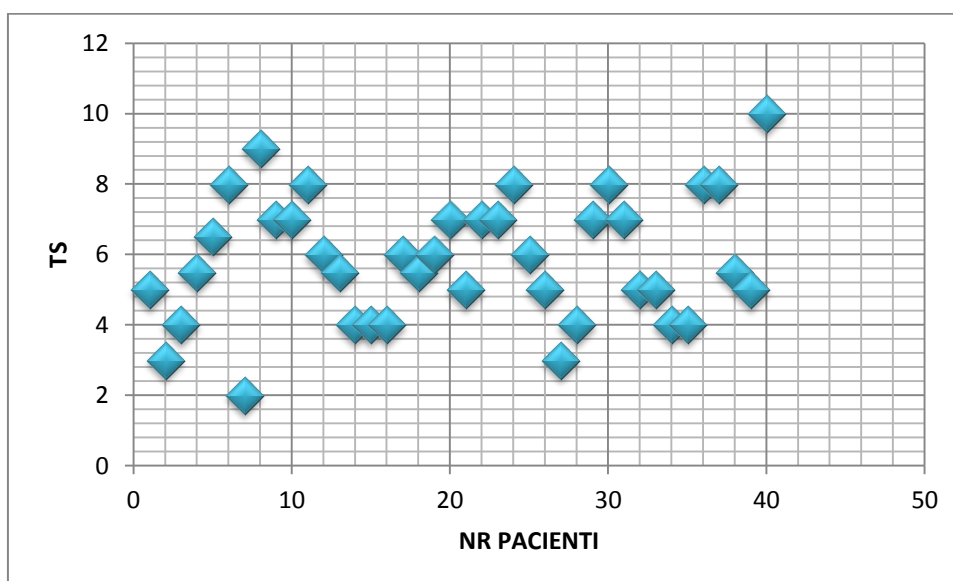


Fig.43 Valorile timpului de sângerare la pacienții trombocitopenici

Valoarea medie a timpului de sângerare a pacienților trombocitopenici este de 5.8 minute, în concordanță cu tendința spre sângerare afirmată prin numărul mediu de trombocite. Coeficientul de corelație Pearson este -0.67, ceea ce sugerează o corelație mijlocie negativă între cele două determinări: cu cât numărul de trombocite scade, cu atât timpul de sângerare va fi mai mare.

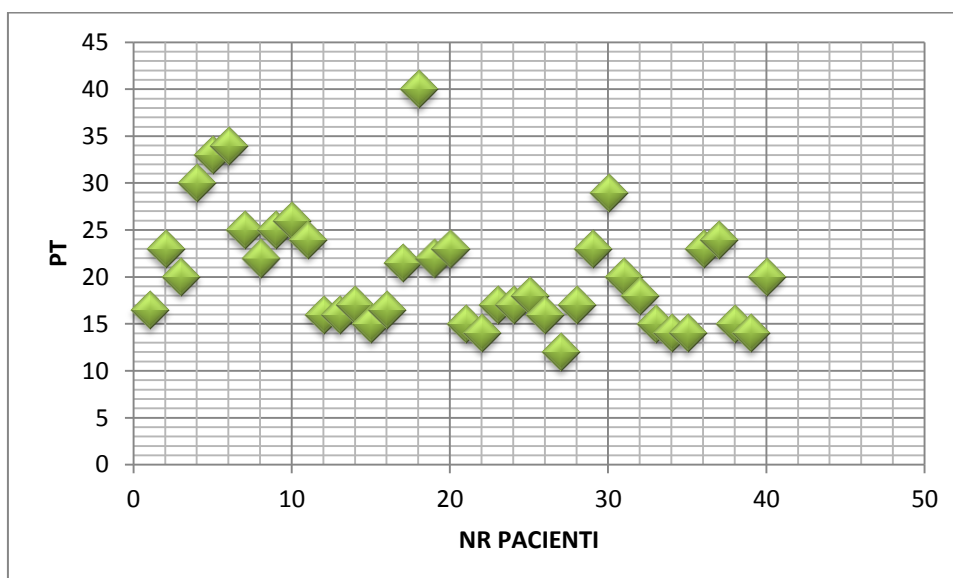


Fig.44 Valorile timpului Quick (PT) la pacienții cu PTI

Fig.44 evidențiază valorile timpului Quick la pacienții din lotul H, cu o valoare medie de 20.51 sec și o deviație standard de ± 6.25 . Coeficientul de corelație Pearson calculat între

numărul de trombocite și valorile PT este $r = -0.61$, ceea ce sugerează o corelație negativă între aceste două determinări.

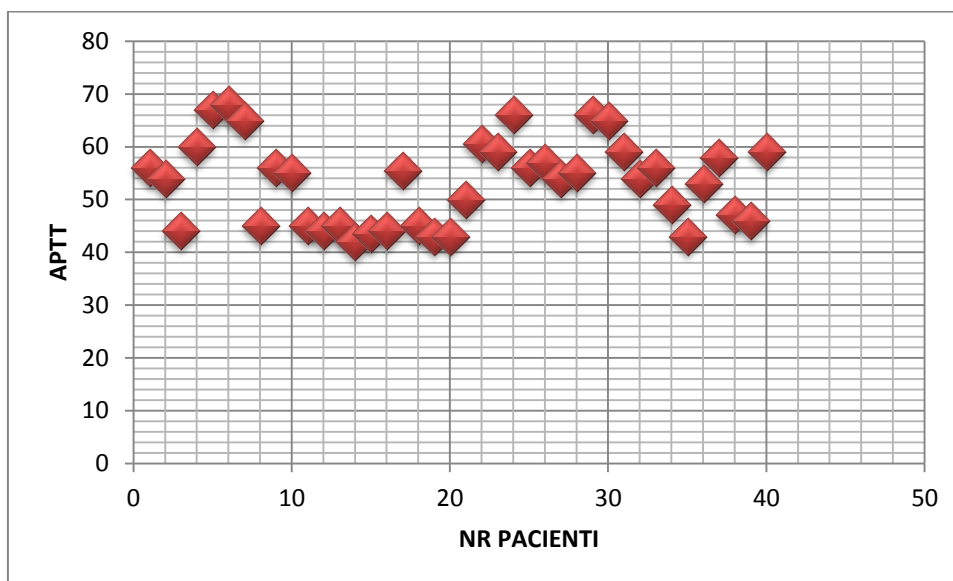


Fig.45 Valorile aPTT la pacienții lotului H

Fig.45 evidențiază valorile obținute pentru aPTT la pacienții trombocitopenici, cu o medie de 53.3 sec și o deviație standard de ± 7.95 . Coeficientul de corelație Pearson între numărul trombocitelor și valoarea aPTT este de -0.5 , ceea ce sugerează o corelație negativă între cele două determinări.

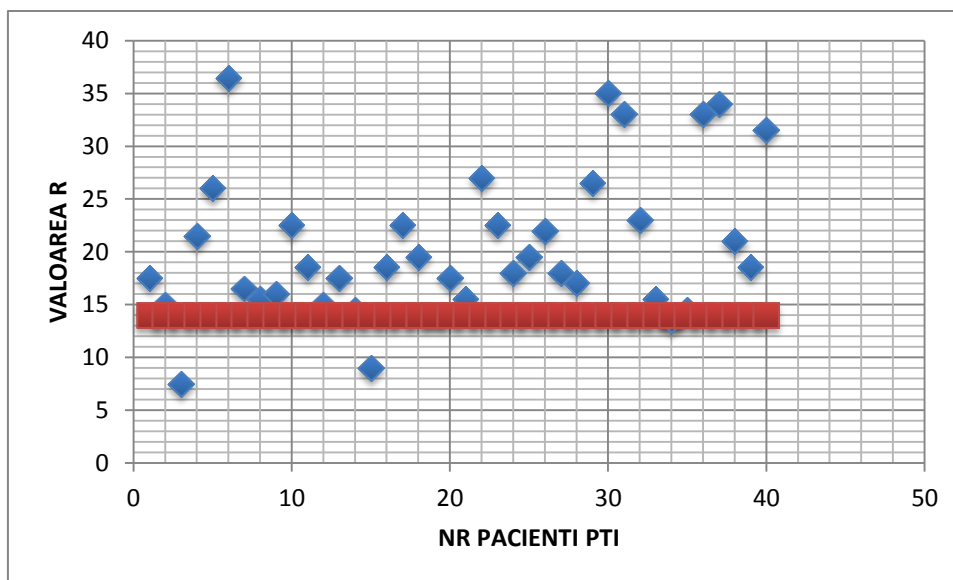


Fig.47 Valorile parametrului R pentru pacienții trombocitopenici

Fig.47 evidențiază valorile parametrului trombelastografic R la pacienții trombocitopenici, majoritatea cu valori peste limita superioară a intervalului de referință, cu media de 20,48 și SD ± 7 . Linia orizontală reprezintă valoarea maximă normală a lui R. Există o corelație semnificativă negativă între valorile parametrului R și ale trombocitelor, cu $r = -0.62$.

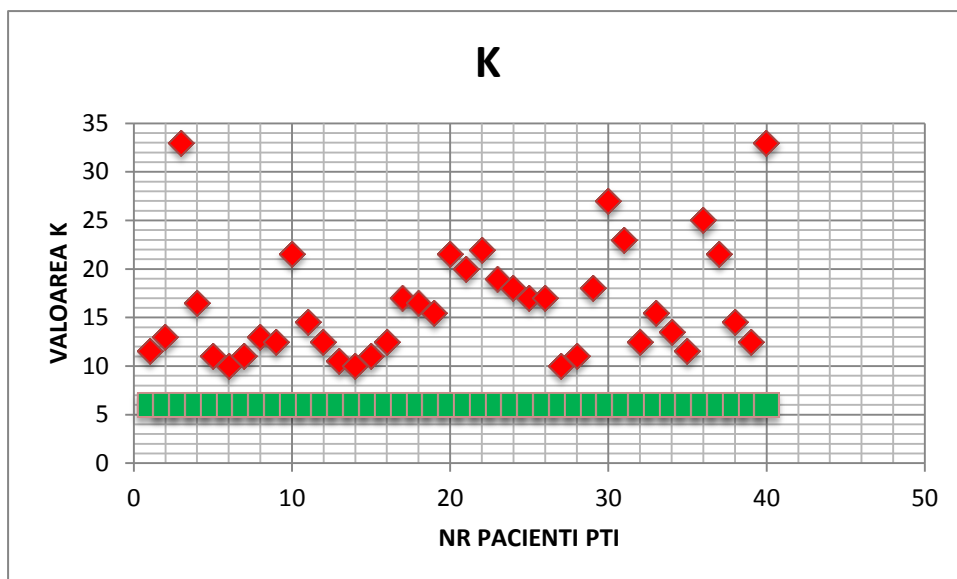


Fig. 48 Reprezentarea grafică a valorilor parametrului K

Fig.48 evidențiază reprezentarea grafică a valorilor parametrului K pentru lotul H, cu valoarea medie de 16.4 și deviație standard ± 5.89 , iar $r = -0.27$, ceea ce sugerează o legătură slabă între numărul de trombocite și valorile K. Toate valorile K se află peste limita superioară a intervalului de referință, ceea ce sugerează în continuare tendința spre hipocoagulabilitate și riscul de sângerare.

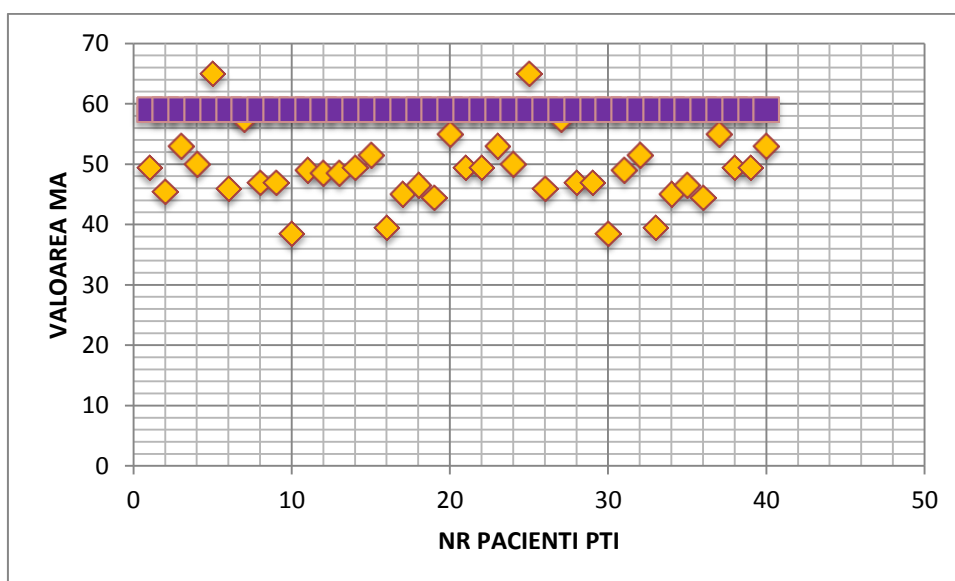


Fig.50 Reprezentarea grafică a valorilor amplitudinii maxime pentru lotul H

Fig.50 evidențiază rezistența scăzută a cheagului de sânge care se realizează în condiții de trombocitopenie, cu risc de sângerare. Valoarea medie a MA este de 49.86, cu deviație standard ± 5.82 .

Testele uzuale de hemostază oferă informațiile inițiale asupra posibilei etiologii a sângerării. Dintre acestea, timpul de sângerare este considerat totuși neadecvat pentru excluderea disfuncțiilor comune trombocitare. Acest test este prelungit în afecțiuni legate de numărul și funcția trombocitară, precum trombostenia Glanzmann și sindromul Bernard-Soulier, dar nu poate fi utilizat ca un predictor al riscului de sângerare (1).

În studiul nostru, numărul de trombocite s-a corelat negativ cu valorile timpului de sângerare, a PT, aPTT și INR, iar valorile parametrului trombelastografic R prezintă o corelație puternică pozitivă cu timpul Quick și aPTT. Valorile unghiului alfa și K prezintă o corelație slabă cu PT.

Valorile unghiului α și parametrul K relevă cât de repede forțele de sfâșiere și torsiune se dezvoltă în cheag, adică rata de formare a cheagului. Acest timp va varia dacă există deficiențe în privința factorilor coagulării sau trombocitelor. Variații există la pacienții cu trombocitopenie și hipofibrinogenemie.

Timpul de reacție R reflectă întârzierea în generarea trombinei și subsecvent în formarea fibrinei, etape influențate de numărul de trombocite, dar și de deficite congenitale ale factorilor de coagulare. Putem concluziona că trombelastografia include informațiile oferite de testele uzuale de hemostază și oferă în plus informații despre desfășurarea procesului de coagulare.

Există studii care descriu utilizarea trombelastografiei în timp real pentru evaluarea statusului perioperator al pacienților care suferă diverse intervenții chirurgicale. Astfel, TEG devine un asistent al anestezistului (4) care va decide utilizarea factorilor de coagulare sau a produselor de sânge pe baza acestor rezultate.

În aceeași idee, TEG ar putea fi utilizată în monitorizarea pacienților cu PTI pentru aprecierea riscului de sângerare și pentru decizia tratamentului substitutiv cu masă trombocitară.

Pentru conturarea statusului fluido-coagulant, s-au efectuat testele uzuale de hemostază, dar și trombelastografia, o metodă care nu este utilizată în România, însă este folosită în clinică, dar și în cercetare, în numeroase studii pe plan internațional, metodă care va spori acuratețea diagnosticului în sindroamele hemoragipare.

Prin efectuarea trombelastografiei la acești pacienți, am evidențiat utilitatea și necesitatea folosirii acestei metode în clinică pentru stabilirea tendinței spre hipocoagulabilitate în sindroame hemoragipare la copii.

STUDIUL III – Testarea profilului de trombofilie la copiii cu tromboze vasculare.

Rezultatele vor fi expuse sub formă de grafice și tabele. Luând în considerare numărul mic de cazuri din lotul T, nu se poate realiza o prelucrare statistică a datelor, deoarece sursa de eroare ar fi prea mare.

Tabel XV Valorile medii ale VTM și LDT la pacienții cu manifestări trombotice

	Min	Max	medie
VTM	8.6	13.4	10.558
LDT	9.2	13.4	11.141

Pentru volumul trombocitar mediu, se înregistrează un minim de 8.6 fl și un maxim de 13.4 fl, cu o medie de 10.558 fl. Pentru lărgimea distribuției trombocitare, se înregistrează o valoare minimă de 9.2% și o valoare maximă de 13.4%, cu valoarea medie de 11.14%.

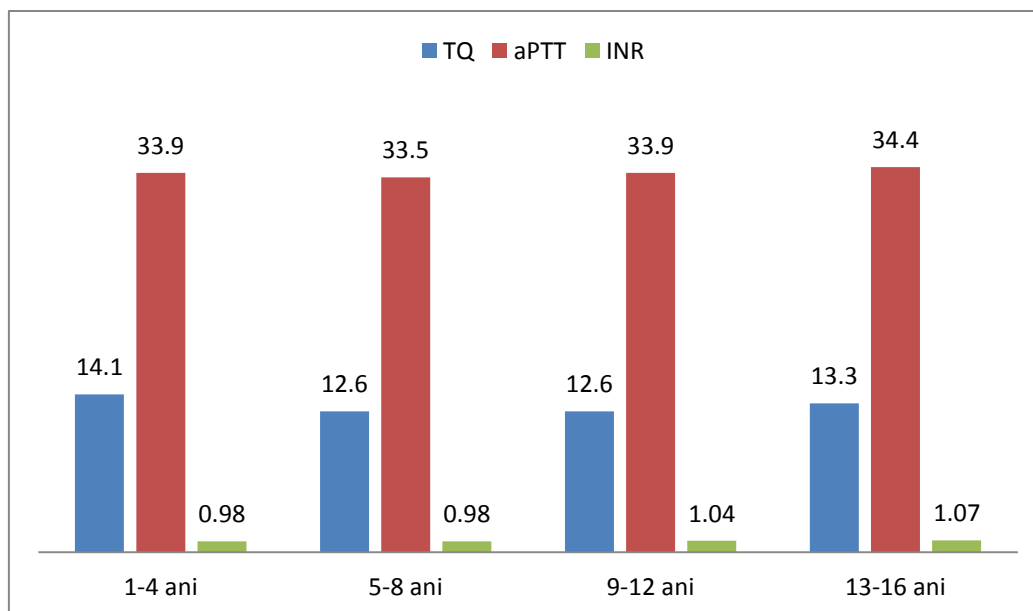


Fig.55 Reprezentarea grafică comparativă a valorilor medii ale TQ, aPTT și INR la pacienții cu manifestări trombotice

Pentru grupa de vârstă 1-4 ani, se observă că valorile timpului Quick se încadrează în valorile normale, la fel ca cele ale INR-ului, însă cu ușoară creștere comparativ cu valorile medii pentru celelalte grupe de vârstă .

Valorile aPTT pentru toate grupele de vârstă se încadrează în valorile normale.

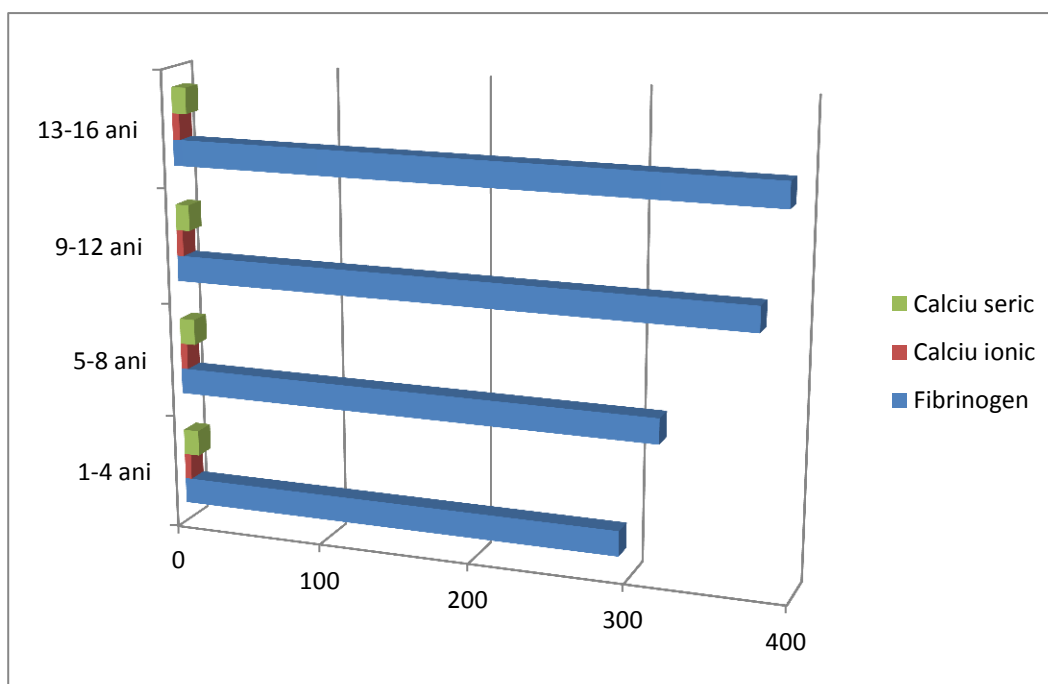


Fig. 56 Reprezentarea grafică comparativă a valorilor medii ale fibrinogenului, calciului ionic și calciului seric pe grupe de vârstă la pacienții cu manifestări trombotice

Se observă creșterea valorilor medii ale fibrinogenului pe măsura creșterii vârstei.

Valorile calcemiei, atât pentru calciul ionic, cât și pentru calciul seric, sunt în limite normale și comparabile pentru toate grupele de vârstă, fapt ce sugerează că acest factor implicat în coagulare nu influențează starea echilibrului fluido-coagulant la pacienții din lotul studiat.

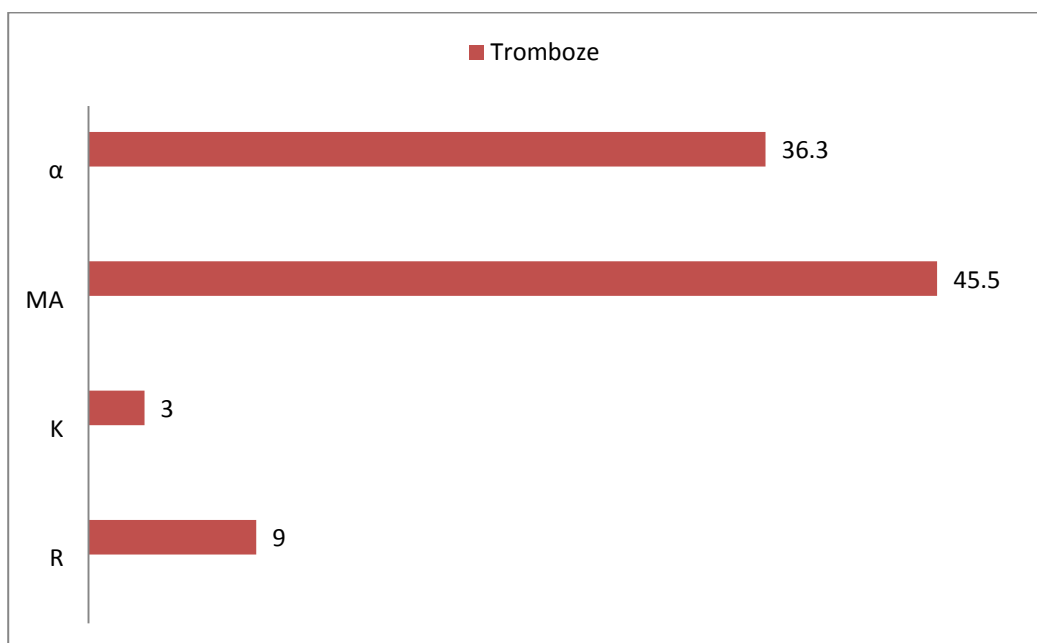


Fig.57 Reprezentarea grafică a valorilor medii ale parametrilor trombelastografici la pacienții lotului T

Evaluarea trombelastografică evidențiază valori ale parametrilor care se încadrează și par a sugera un status hipercoagulabil la pacienții lotului T.

Tabel XVI Determinarea profilului trombofilic la pacienții cu manifestări trombotice

Nr. Crt.	Mutatia F V Leiden	Mutatia protrombinica	Proteina C	Proteina S	Antitrombina
1.	Negativ	Negativ	71%	92%	86%
2.	Negativ	Negativ	93%	95%	105%
3.	Negativ	Negativ	86%	88%	99%
4.	Negativ	Negativ	93%	89%	105%
5.	Negativ	Negativ	96%	81%	94%
6.	Negativ	Negativ	88%	95%	99%
7.	Negativ	Negativ	92%	82%	85%
8.	Negativ	Negativ	102%	97%	94%
9.	Negativ	Negativ	89%	92%	98%
10.	Negativ	Negativ	105%	78%	102%

Tabel XVII Valorile homocisteinemiciei la pacienții din lotul T

Nr. Crt.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Homocisteina (μmol/l)	4.29	5.25	6.79	5.25	6.22	7.1	6.09	5.9	6.1	7.05

După determinarea mutațiilor genei MTHFR la pacienții din lotul studiat, modificări au fost înregistrate la șase dintre ei. Dintre aceștia, 3 pacienți (50%) sunt heterozigoți pentru C677T, având ca diagnostic accident vascular cerebral ischemic. Doi pacienți (33%) prezintă mutații homozigote pentru C677T, cu diagnosticul de tromboză de venă portă , respectiv

tromboză de sinus cavernos și doar unul este heterozigot pentru A 12980, diagnosticat cu tromboză de venă cavă în cadrul unui hepatocarcinom.

Mutațiile genei MTHFR au fost legate de numeroase afecțiuni, incluzând cancerul de colon, leucemia acută, bolile vasculare etc. Cele mai frecvente mutații MTHFR sunt C677T și A1298C.

Majoritatea copiilor care dezvoltă o tromboză au probabil mai mulți factori de risc coexistenți. Mai multe studii tip cohortă sugerează că factorii ereditari nu joacă un rol determinant în majoritatea evenimentelor trombotice la copii (16, 17, 18).

Unele studii sugerează faptul că testarea pentru trombofilie în jurul episodului acut va genera un diagnostic incorect, având în vedere că nivelurile antitrombinei, proteinei C și proteinei S pot fi tranzitor scăzute în timpul trombozei acute. Orice modificare a acestor teste va obliga la repetarea testării. Analiza mutațiilor genetice, în schimb, nu va fi afectată de afecțiunea acută.

Manifestările trombotice la copii evaluate utilizând testele uzuale de hemostază nu au evidențiat modificări din sfera statusului procoagulant.

Trombelastografia este singura determinare care conturează un status mai coagulabil prin scurtarea timpului de reacție R și a timpului de formare a cheagului K.

Evenimentele trombotice pot fi promovate de boli protrombotice, printre care defectele genetice homozigote sau heterozigote, motiv pentru care s-a decis efectuarea profilului de trombofilie.

Nu s-a înregistrat nici o modificare a valorilor factorilor anticoagulanți în urma determinării profilului inițial de trombofilie.

Deoarece statusul hipercoagulabil presupune un diagnostic elaborat, pornind de la manifestări clinice de multe ori nespecifice, alături de investigații de laborator costisitoare, multe dintre ele suportate doar de pacient, am considerat util studiul manifestărilor trombotice prin analize de genetică moleculară.

Rămâne un deziderat să putem stabili o corelație între existența acestor mutații și riscul apariției manifestărilor trombotice, alături de oportunitatea tratamentului anticoagulant care să diminueze incidența evenimentelor acute.

Decizia testării pentru trombofilie pentru membrii familiilor celor afectați de tromboză trebuie să fie o decizie comună medic-pacient, îndelung cântărită, deoarece o posibilă tară genetică prezentă va modifica radical viața acestor pacienți încă asimptomatici.

Nu există încă ghiduri pentru diagnostic și tromboprofilaxia manifestărilor tromboembolice la copil.

STUDIUL IV – Evidențierea detaliilor de ultrastructură trombocitară la pacienții cu purpură trombocitopenică cu ajutorul microscopiei electronice

Măsurarea dimensiunilor trombocitelor – aprecierea diametrului lung al trombocitelor

Măsurarea diametrului structurilor observate la microscopul electronic a permis identificarea trombocitelor și evidențierea macrotrombocitelor (cu diametrul peste 6 μ). Procentul de macrotrombocite la pacienții sănătoși s-a încadrat în procentul menționat în literatura de specialitate, adică sub 5%. Procentul de macrotrombocite obținut la pacienții cu PTI a fost de 16.83%.

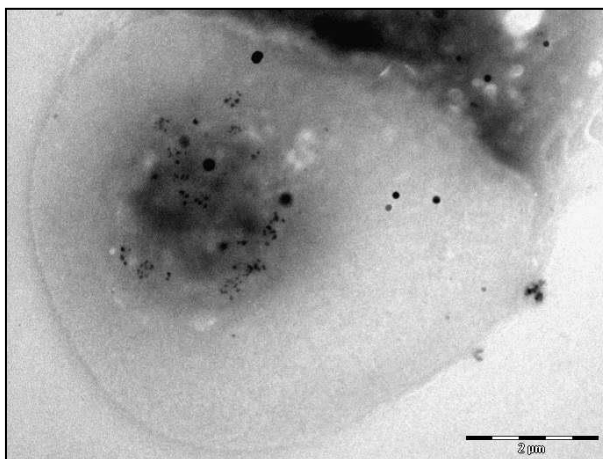


Fig.63 Macrotrombocit la pacient cu PTI

Numărarea granulelor dense/trombocit

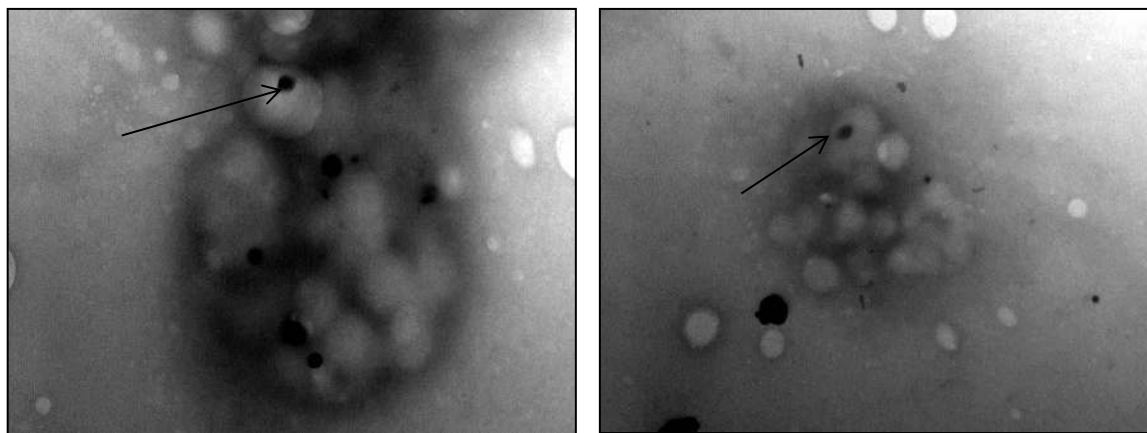


Fig.64 Granule dense trombocitare. Tehnica WHOLE MOUNT.

La microscopul electronic, folosind tehnica whole mount, datorită membranei lipidice, trombocitele vor fi transparente, în timp ce granulele δ sunt electron opace, de formă rotundă, foarte bine delimitate.

Numeroase granule δ pot avea cozi lungi, în formă de bici care se întind pe distanțe lungi în citoplasmă, unele trombocite conținând chiar mai mult de una. Originea lor rămâne obscură, dar cozile reprezintă un ajutor pentru identificarea corpurilor denși.

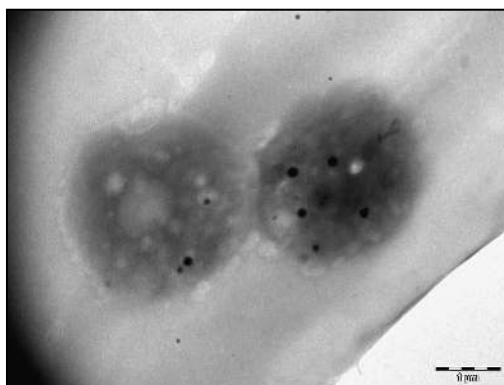


Fig.67 Granule dense trombocitare la pacient cu PTI

Fig.67 evidențiază aspecte morfologice ale trombocitelor unui pacient cu PTI cronic, fără sângerare activă. Număr mediu granule dense/trombocit obținut la pacienții trombocitopenici cu manifestări hemoragice ușoare este de 7.84 granule dense/trombocit.

Număr mediu granule dense/trombocit la pacienții trombocitopenici fără manifestări hemoragice este de 4.72 granule dense/trombocit.

Măsurarea dimensiunilor granulelor dense

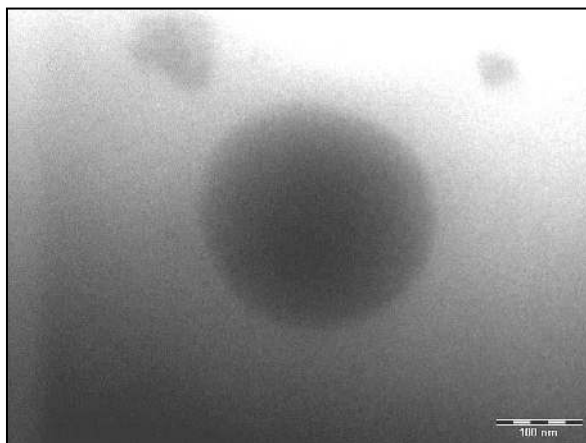


Fig.69 Aspect de ME al unei granule dense trombocitare, opacă, bine delimitată, $\Phi=200$ nm.

Măsurarea dimensiunilor granulelor dense a permis stabilirea diametrului, cu valori cuprinse în limitele normale descrise în literatura de specialitate (100-300 nm).

Evidențiere de cozi în formă de bici

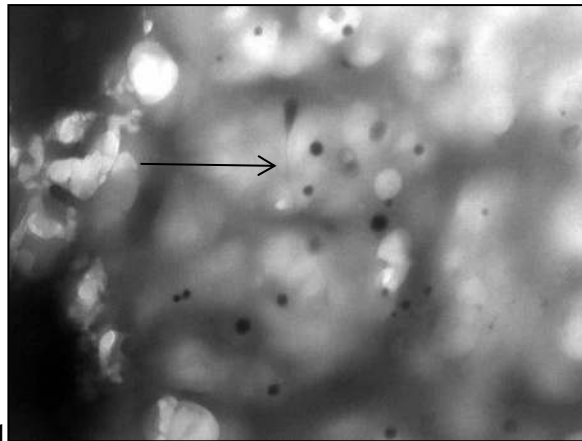


Fig.71 Aspect de structură intratrombocitară în formă de bici (whip-like) la pacient sănătos. Tehnica WHOLE MOUNT.

Evidențierea structurilor dense de tip inelar

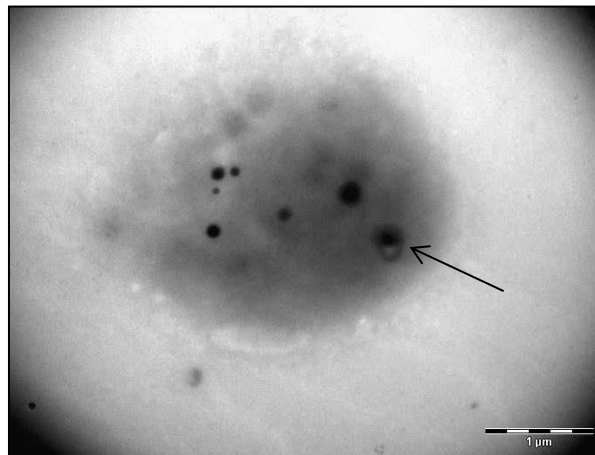


Fig.77 Aspect de structură densă de tip inelar la pacinet cu PTI cu sângerare ușoară.

Evidențierea granulelor de tip “fuzzy ball”

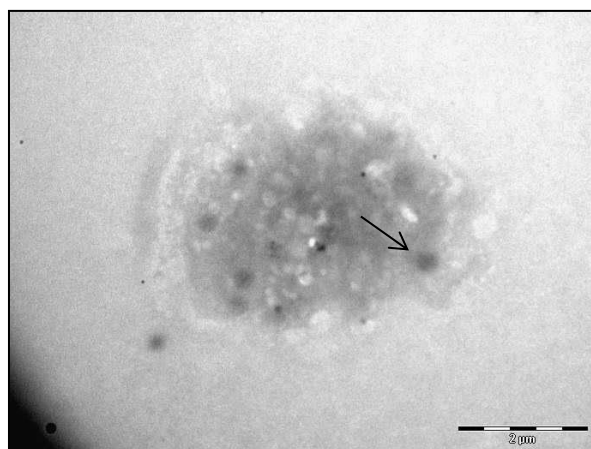


Fig.81 Aspect de granulă densă de tip “fuzzy ball” la pacient cu PTI cu sângerare ușoară. Tehnica WHOLE MOUNT

Evidențierea altor tipuri de granule dense, cu formă variată

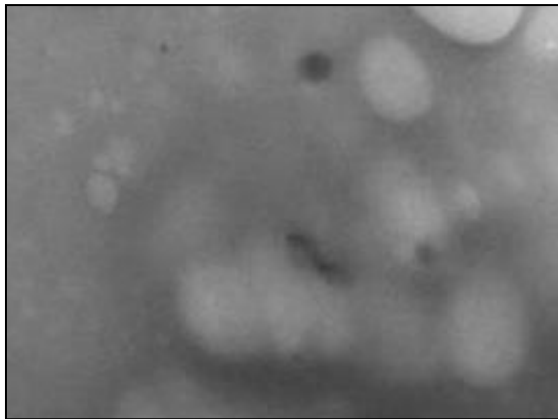


Fig.83 Aspect de granulă densă cu aspect atipic la pacient cu PTI cu sângerare ușoară. Tehnica WHOLE MOUNT

Evidențierea structurilor trombocitare sub formă de lanțuri

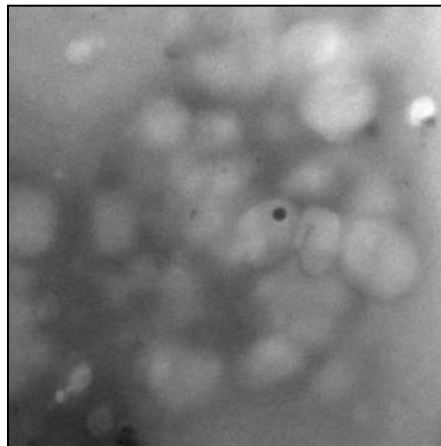


Fig.84 Aspect de lanțuri intratrombocitare la pacient sănătos. Tehnica WHOLE MOUNT

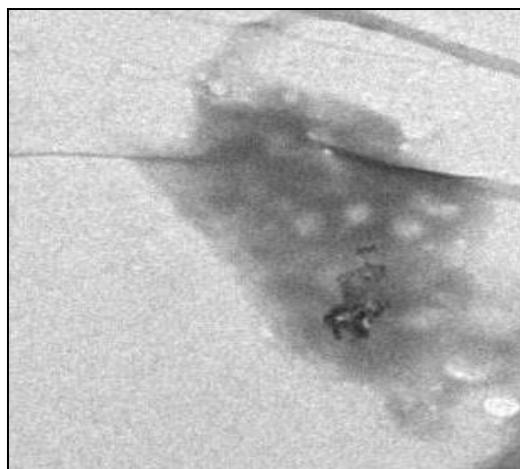


Fig.85 Aspect de lanțuri intratrombocitare la pacient cu sângerare ușoară. Tehnica WHOLE MOUNT

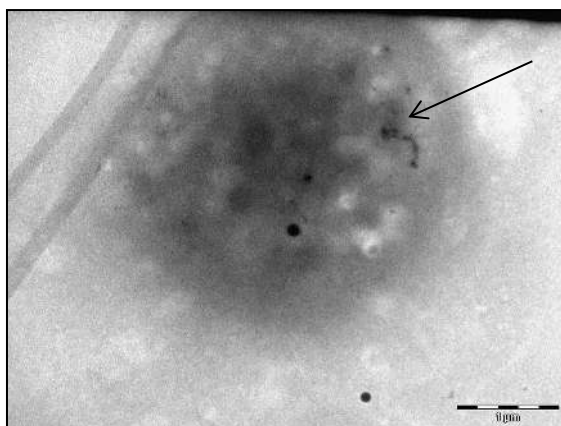


Fig.86 Aspect de lanțuri intratrombocitare la pacient cu PTI fără sângerare. Tehnica WHOLE MOUNT
Evidențierea structurilor intratrombocitare sub formă de aglomerări/ciorchine (cluster)

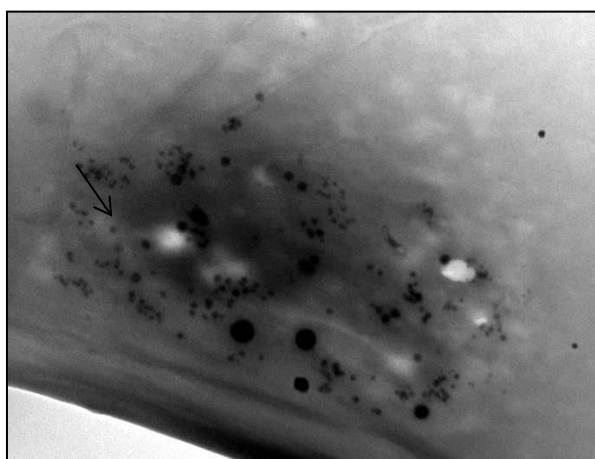


Fig.90 Aspect de clusters la pacient cu PTI cu sângerare ușoară. Tehnica WHOLE MOUNT
Evidențierea granulelor α

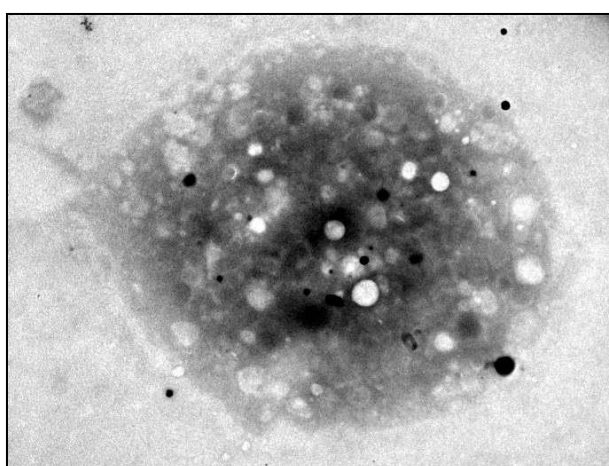


Fig.92 Granule alfa intratrombocitare

Pentru studiul nostru, numărătoarea granulelor dense a permis încadrarea rezultatelor în limitele normale stabilite de literatura de specialitate, inclusiv pentru pacienții cu

manifestări hemoragice ușoare, ceea ce a demonstrat că sindromul hemoragic nu se datora deficitului de granule dense.

Granulele dense reprezintă locul de stocare pentru adenin-nucleotide și serotonină (3).

Granulele dense sunt ușor detectabile în secțiuni fine, dar și folosind tehnica WHOLE MOUNT, absența sau scăderea numărului lor fiind diagnostice pentru afecțiunile cu deficit de stocaj – storage pool deficiency – cum ar fi sindromul Hermansky-Pudlak (4).

Identificarea granulelor dense poate duce la confuzii cu alte structuri care apar dense, opace la microscopul electronic, precum structuri inelare, aglomerări (clusters) și lanțuri (chains). Chiar și unele granule alfa suficient de opace pot fi considerate eronat granule delta.

Structurile care apar dense la microscopul electronic, dar au o morfologie diferită de tipul clasic descris al granulelor delta, apar într-un număr redus de celule atât la pacienții sănătoși, cât și la cei trombocitopenici. Lanțurile și aglomerările sub formă de ciorchine sunt prezente în aproximativ 5% din trombocitele pacienților pediatrici, la fel ca și la adulți. Nu se cunoaște încă dacă există vreo legătură între incidența acestor structuri și o anumită patologie trombocitară (5). Se pare că pacienții adulți au totuși un număr mai mare de astfel de structuri. Unii autori expun chiar un procent de 50% pentru unii pacienți adulți, dar menționează și indivizi care nu au astfel de structuri la nivel trombocitar, probabil prin examinarea unui număr insuficient de trombocite.

S-a demonstrat că aceste structuri dense apar inclusiv la pacienții cu trombocite deficitare în granule delta, ceea ce sugerează faptul că lanțurile și aglomerările nu reprezintă stadii intermediare pentru granulele delta și nu au nici măcar aceeași origine. Există ideea că anumite zone membranare ale aparatului Golgi sau reticulului endoplasmic ar putea fi implicate în formarea lor.

Lanțurile care apar în câteva trombocite atât la pacienți sănătoși, dar și la cei trombocitopenici, au aspect variabil în funcție de lungime, putând fi scurte sau mai lungi, contorsionate în citoplasmă.

Aglomerările sub formă de ciorchine au și ele dimensiuni variabile, majoritatea fiind mai mici decât granulele delta, cu aspect mai puțin conturat, dar cu o organizare particulară sugerată de dispunerea acestora pe o traiectorie elipsoidală, ca și cum s-ar afla pe suprafața unui organit cu membrană încă nevizualizabilă. Unii autori sugerează că aglomerările descrise se obțin prin fuzionarea unor fragmente de lanțuri (5).

Uneori, granule alfa cu priza de contrast mai mare pot fi confundate cu granule delta, însă ele nu prezintă un contur bine delimitat și pot fi identificate cu precizie prin realizarea de secțiuni fine.

Trombocitopeniile ereditare considerate boli rare au început a fi diagnosticate din ce în ce mai mult în ultima perioadă. Confundarea cu trombocitopenia autoimuna idiopatică este frecventă, iar terapia va fi inadecvată (6). Pentru a evita această eroare, au fost utilizați diverși parametri cu rol diagnostic, precum severitatea sângerării, caracterul ereditar, cinetica și detaliile funcționale trombocitare, coroborate cu anomalii clinice concomitente (7). Cel mai ușor, diferențierea se poate face utilizând VTM, care separă cazurile de macrotrombocitopenie de trombocitopenia. Există descrieri de organite cu dimensiuni mari în interiorul megakariocitelor pacienților cu trombocitopenie (8).

6. CONCLUZII

- Pentru un diagnostic corect, evaluarea completă a manifestărilor trombotice sau hemoragice la copii implică un plan de investigații complex, care, printre altele, trebuie să urmărească și întreaga fiziologie și fiziopatologie trombocitară.
- Este dificil de realizat acest plan utilizând numai teste uzuale de hemostază, de aceea am considerat că analiza tulburărilor de coagulare la vârsta pediatrică necesită câteva determinări speciale care să ofere informații prețioase despre structura și funcționalitatea trombocitară, ceea ce reprezintă **elementul original al tezei**, și anume trombelastografia și microscopia electronică.
- Pacienții pediatrici reprezintă mereu o vârstă dificil de investigat, chiar dacă patologia este asemănătoare cu a adultului, iar studiile referitoare la parametrii lor biologici necesită efort suplimentar prin particularitățile vârstei.
- Pentru **studiul I**, datele obținute în urma evaluării trombelastografice au fost utilizate pentru calibrarea trombelastografului și obținerea unor intervale de referință pentru subloturile studiate. Compararea acestor date cu valorile propuse de producător a dus la observarea unor diferențe foarte mici în ceea ce privește intervalul de referință pentru fiecare parametru în parte, ceea ce ne-a permis utilizarea acestor intervale în determinările ulterioare.
- Nu există diferențe semnificative statistic între parametri trombelastografici obținuți la copii pe grupe de vârstă, dar se poate sugera ideea că pacienții lotului III și IV se apropie cel mai mult de valorile adulților.
- Uneori se poate observa o discordanță între datele numerice prezentate și funcționalitatea sistemului hemostatic și de coagulare, discordanță care explică necesitatea stabilirii propriilor intervale de referință ținând cont de caracteristicile pacienților investigați.
- Există studii care sugerează existența unor variații regionale, de aceea, pe baza rezultatelor obținute, suntem în consens cu indicațiile producătorului TEG de stabilire a intervalelor proprii.
- Pentru stabilirea unor intervale de referință în concordanță cu grupele de vârstă studiate, este nevoie de studii pe mai mulți subiecți, copii sănătoși aparținând aceluiași areal geografic.

- În **studiul II** am încercat stabilirea de corelații între testele uzuale de hemostază și trombelastografia efectuată la pacienții cu PTI. Prin efectuarea trombelastografiei la acești pacienți, am evidențiat rapiditatea obținerii rezultatelor și necesitatea folosirii acestei metode în clinică pentru stabilirea tendinței spre hipocoagulabilitate în sindroamele hemoragipare la copii.
- În **studiul III**, evaluarea hemostazei bazat pe metodele clasice nu evidențiază modificări posteveniment trombotic, însă trombelastografia permite cu acuratețe evidențierea tendinței spre hipercoagulabilitate în eventualitatea unor stări protrombotice preexistente. Homocisteina nu a fost relevantă în monitorizarea riscului de evenimente tromboembolice, probabil deoarece determinarea este făcută la distanță de evenimentul acut; ea rămâne un parametru de determinat pentru statusul hipercoagulabil secundar.
- **Studiul IV** se dorește a fi o analiză a morfologiei trombocitelor pacienților pediatrici cu număr normal de trombocite și a trombocitelor pacienților trombocitopenici.
- Cu ajutorul microscopului electronic, a fost evidențiat aspectul morfologic al structurilor dense intratrombocitare sub forma granulelor delta, a lanțurilor și aglomerărilor, dar și granulele alfa.
- Pentru pacienții trombocitopenici studiați, numărul granulelor dense se încadrează în intervalele de referință cunoscute, deci manifestările hemoragipare nu se datoresc deficitului de granule dense.
- Propunem utilizarea trombelastografiei și a microscopiei electronice ca teste de rutină în evaluarea patologiei hemoragipare la pacienții pediatrici deoarece reprezintă examinări care oferă informații prețioase despre stuctura și funcția trombocitară și permit un diagnostic rapid și ținut în cadrul patologiei studiate.

7. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Șerban M, Schramm W - Hemostazeologie clinică, Ed. Brumar, Timișoara, 2001.
2. Boulton F - A hundred years of cascading – started by Paul Morawitz (1879-1936), a pioneer of haemostasis and transfusion. *Transfus Med.*2006; 16(1):1-10.
3. Țuțuianu B – Fiziologia coagulării – despre modelul celular (I), *Jurnalul de Chirurgie*, vol. 3, nr.2, Iași, 2007 .
4. Cucuianu M – Hemostaza. Biochimie, Fiziopatologie clinică. Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1994.
5. Ion I, Badiu Gh – Fiziologie -curs, Ed Ex Ponto, Constanța, 2000.
6. Ruggeri ZM - Old concepts and ne developments in the study of platelet aggregation, *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, vol.3, (6).
7. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM - Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):657-66.
8. Ruggeri ZM, Dent JA, Saldívar E - Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*. 1999 Jul 1;94(1):172-8.
9. Hăulică I – Fiziologie umană, ediția a 2-a, Ed. Medicală, București, 1997.
10. Colman RW, Clowes AW, George JN et al - Overview of hemostasis. In *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006. p. 1–16.
11. Ganong WF - Review of Medical Physiology, Ed. Appleton & Lange, Conecticut, 1993.
12. Ionică N, Farcaș C – Fiziologie, Ovidius University Press, Constanța, 2002.
13. Hoffman M, Monroe DM - Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:1–11.
14. Mann KG, Brummel K, Butenas S - What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1504–1514.
15. Guyton AC, Hall JI – Textbook of Medical Physiology, 12th ed., Ed. W.B. Saunders Elsevier, Hall, Philadelphia, 2011.
16. Lanzkowsky P – Pediatric Hematology and Oncology, Churchill Livingstone, NJ, 1995.
17. http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/hemostasis/overview_of_hemostasis.html - Last full review/revision July 2012 by Joel L. Moake, MD.
18. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC – Coagulation Testing in Pediatric patients: the Young Are Not Just Miniature Adults. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 33, no. 8, 2007.
19. Monagle P, Ignjatovic V, Savoia H – Hemostasis in neonates and children: pitfalls and dilemmas. *Blood Reviews* 24 (2010), 63-68.
20. Sola-Visner M – Platelets in neonatal period: developmental differences in platelet production, function and hemostasis and the potential impact of therapies. – *ASH Education Book* 2012; 2012:1; 506-511.
21. White JG: Use of the electron microscope for diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 1998;24(2):163-168.
22. Catherine P.M. Hayward, Karen A. Moffat, Ernie Spitzer, Marnie Timleck, Elizabeth Plumhoff, Sara J. Israels, and James White, on behalf of the NASCOLA Working Group on Platelet Results of an

- External Proficiency Testing Exercise on Platelet Dense-Granule Deficiency Testing by Whole Mount Electron Microscopy. *Am J Clin Pathol* 2009;131:671-675.
23. Handbook of Diagnostic Hemostasis and Thrombosis Tests. Third Edition 2005. University of Washington, Department of Laboratory Medicine, Coagulation Laboratory.
 24. Harrison P, Mackie I, Mumford A et al – Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function, British Committee for Standards in Haematology, August 2013.
 25. Favaloro EJ, Funk (Adcock) DM, Lippi G – Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. *Lab. Med.* 2012;43(2):1-10.
 26. Van Nispen tot Pannerden HE, van Dijk SM, Du V, Heijnen HFG – Platelet protein disulfide isomerase is localised in the dense tubular system and does not become surface expressed after activation. *Blood.* 2009; 114(21): 4738-4740.
 27. Heijnen HF, Debili N, Vainchenker W et al – Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood.*1998;91(7): 2313-2325.
 28. Ambrosio AL, Boyle JA, Di Pietro SM - Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood*, 8 nov 2012, vol 120, no.19.
 29. White JG – Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets.*2008 Sep;19(6):455-66.
 30. White JG, Witkop CJ jr – Effects of normal and aspirin platelets on defective secondary aggregation in the Hermansky-Pudlak syndrome: a test for storage pool deficient platelets. *Am J Patol* 1972;68:57-66.
 31. White JG - Electron-dense chains and clusters in platelets from patients with storage pool-deficiency disorders. *J Thromb Haemost.* 2003 Jan;1(1):74-9.
 32. Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S, Belletti S, Poggi V, Iolascon A – Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001, vol. 97, no.5, 1330-1335.
 33. White JG, Ahlstrand GG – Giant electron dense chains, clusters and granules in megakaryocytes and platelets with normal dense bodies: an inherited thrombocytopenic disorder III. Platelet analytical electron microscopy. *Platelets*, 2003 Aug;14(5):305-12.