

# Badanie retykulopłytek — normy hematologiczne oraz wahania liczby retykulopłytek w czasie

## Reticulated platelets — hematological norm and fluctuation in the number of reticulated platelets with time

Justyna Karandys<sup>1</sup>, Dorota Siwik<sup>2</sup>, Krystyna Maślanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

<sup>2</sup> Pracownia Krwinek Białych i Płytkowych, Dział Immunologii Transfuzjologicznej Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie

### Streszczenie

**Wstęp:** Retykulopłytki (RP) są najwcześniejszą postacią płytek krwi obecną we krwi obwodowej. W związku z coraz szerszym zastosowaniem diagnostycznym badań dotyczących RP obecna praca ma na celu: ustalenie norm hematologicznych dla RP u zdrowych osób i sprawdzenie, czy ich liczba ulega wahaniom w odstępie czasu. Jednocześnie sprawdzono, czy liczba RP może być oznaczana nie tylko w dniu pobrania próbki krwi, ale także z materiału przechowywanego na następny dzień.

**Materiał i metody:** Do badań użyto próbki krwi pobrane na EDTA od 148 osób. Odsetek/wartość bezwzględna RP oznaczano techniką immunofluorescencyjną z zastosowaniem podwójnego znakowania: przeciwciałem monoklonalnym anti-CD41 sprzężonym z fikoerytryną oraz oranżem tiazolu. Poziom RP oceniano w cytometrze przepływowym.

**Wyniki:** Norma hematologiczna dla retykulopłytek wynosi: w procentach  $1,3 \pm 0,8\%$ , w wartościach bezwzględnych  $3,29 \pm 2,02 \times 10^3/\mu\text{l}$ ; zakres wartości prawidłowych wyrażony w procentach waha się od 0,5% do 6%, a w wartościach bezwzględnych od 1,26 do  $15,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Oznaczanie RP powinno się wykonywać z próbki krwi pobranej w dniu badania. Liczba RP u zdrowych osób nie ulega istotnym wahaniom w czasie.

**Wnioski:** Normy hematologiczne liczby RP ustalone w wyniku przeprowadzonych przez autorki doświadczeń są zbliżone do wartości prawidłowych podawanych w literaturze.

**Słowa kluczowe:** retykulopłytki, normy hematologiczne RP, metoda badania retykulopłytek

*J. Transf. Med.* 2011; 3: 123–128

### Summary

**Background:** Reticulated platelets (RP) are the youngest platelet forms in peripheral blood. With their diagnostic utility gradually increasing the aim of our study was to establish normal haematological values for RP in healthy individuals and to check their stability over time. Additionally, the aim was to verify, if the RP number had to be determined from fresh blood or the evaluation could be performed on stored blood samples.

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Krystyna Maślanka, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT. Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, ul. Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel.: (22) 349 66 00 wew. 148; e-mail: [kmaslanka@ihit.waw.pl](mailto:kmaslanka@ihit.waw.pl)

**Material and methods:** *Blood samples were freshly collected on EDTA anticoagulant from 148 healthy individuals. To determine the percentage/absolute RP values we used immunofluorescent double labelling with monoclonal antibody anti-CD41-phycoerythrin and thiazole orange. The RP level were analysed using flow cytometry.*

**Results:** *The haematological normal value is —  $1.3 \pm 0.8\%$ ,  $3.29 \pm 2.02 \times 10^3/\mu\text{l}$  (absolute value); range —  $0.5\text{--}6\%$ ,  $1.26\text{--}15.2 \times 10^3/\mu\text{l}$  (absolute number). For RP labelling it is recommended to use freshly collected blood samples. Reticulated platelets level in healthy individuals was stable and did not change significantly with time.*

**Conclusions:** *The hematological norms of RP established during our study are similar to the norms reported in literature.*

**Key words:** reticulated platelets, RP hematological normal level, method for reticulated platelet evaluation

*J. Transf. Med. 2011; 4: 123–128*

## Wstęp

Wiadomo, że płytki krwi, które biorą udział w zachowaniu homeostazy naczyniowej, powstają poprzez odszczepienie fragmentów cytoplazmy z megakariocytów [1]. Pierwszym obecnym we krwi obwodowej stadium rozwojowym płytek krwi są ich młode postaci określane jako retykulopłytki (RP, *reticulated platelets*) [2]. Są one większe niż dojrzałe płytki krwi i zawierają szczątkowe ilości mRNA. Tworzenie się retykulopłytek z megakariocytów może zachodzić: w szpiku kostnym, we krwi lub w płucach. Fragmenty cytoplazmy powstałe w wyniku odszczepienia od megakariocytów podlegają wydłużaniu i zaginaniu, a ostatecznie przyjmują kształt dysku [1, 2].

Retykulopłytki po raz pierwszy opisano w 1969 roku po zastosowaniu techniki bezpośredniej wizualizacji z użyciem błękitu metylenowego, a dopiero w 1990 roku opublikowano pierwszą pracę prezentującą diagnostyczną użyteczność cytometrycznej analizy poziomu RP z wykorzystaniem oranżu tiazolu (TO, *thiazole orange*) [w 3]. Metoda określania poziomu RP nie jest techniką standaryzowaną — opisano jej kilka różnych procedur różniących się między sobą sposobem izolacji, barwienia mRNA czy odczynnikami do oznaczania RP [4–7].

Oznaczanie liczby retykulopłytek znalazło zastosowanie w ocenie procesu odnowy trombopoetycy po przeszczepieniach komórek krwiotwórczych lub u pacjentów z chorobami nowotworowymi po chemoterapii [4–6]. Ocena poziomu RP pozwala także wnioskować, czy małopłytkowość rozwinęła się w wyniku zaburzonego wytwarzania megakariocytów w szpiku kostnym czy zwiększonego niszczenia płytek krwi we krwi obwodowej [6–8]. Badanie RP pomaga w diagnostyce małopłytkowości samoistnej

(ITP, *idiopathic thrombocytopenic purpura*), małopłytkowości wtórnej (ATP, *autoimmune thrombocytopenic purpura*) czy zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*) [5–7].

W związku z coraz szerszym zastosowaniem diagnostycznym badań liczby RP obecna praca ma na celu:

- ustalenie norm hematologicznych dla RP u zdrowych osób;
- określenie, czy liczba retykulopłytek u zdrowych osób ulega wahaniom w odstępie czasu;
- sprawdzenie, czy liczba RP może być oznaczana nie tylko w dniu pobrania próbki krwi, ale także z materiału przechowywanego na następny dzień.

## Materiał i metody

Do badań posłużyła krew pobrana do jałowych próbek (Sarstedt S-Monovettes; Greiner, VACUETTE® EDTA), na antykoagulant EDTA. Wyjściowa objętość krwi do każdego badania wynosiła 2,7 ml.

Próbki krwi pochodziły od:

- 123 pierwszorazowych dawców krwi z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa w Warszawie;
- 25 osób wielokrotnie oddających małe próbki krwi do celów diagnostycznych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

## Isolacja i oznaczanie retykulopłytek

Retykulopłytki izolowano zgodnie ze standardową procedurą operacyjną (SOP, *Standard Operating Procedures*) Pracowni Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi Zakładu Immunologii Hematologicznej

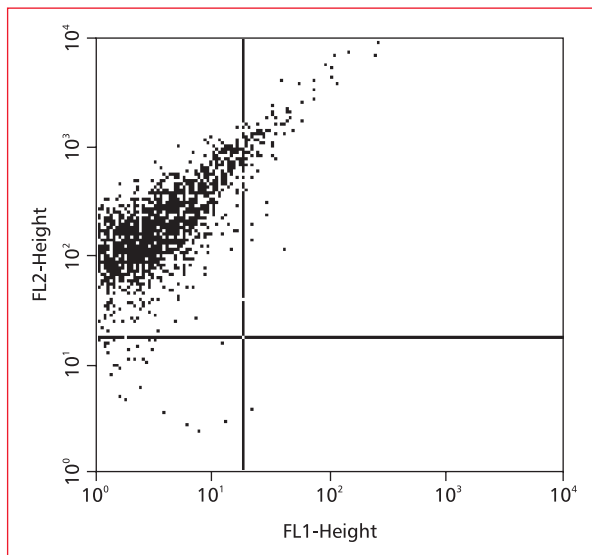
i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (SOP PILIPK T-III-A-9), opracowaną na podstawie prac: Kienast i Schmitz [7] oraz Michur i wsp. [4].

Krew pełną wirowano przez 10 minut przy  $300 \times g$ , następnie zbierano bogatopłytkowe osocze, które wirowano przy  $1400 \times g$  przez 10 minut. Otrzymany osad płytkowy utrwalano poprzez dodanie 1 ml 1-procentowego paraformaldehydu (Sigma) i inkubację w temperaturze pokojowej (ok.  $22^{\circ}\text{C}$ ) przez 60 minut. Retykulopłytki różnicowano w procedurze podwójnego znakowania przeciwciałem monoklonalnym anti-CD41 sprzężonym z fikoerytryną (Dako), które swoiście wiąże się z glikoproteinami IIb/IIIa płytek krwi oraz z oranżem tiazolu (RetiCount, BD Biosciences) łączącym się z mRNA.

Liczbę retikulopłytek oceniano w cytometrze przepływowym FACS Canto II w przeciągu 30 minut od zakończonej inkubacji. Analizę wyników podwójnego barwienia retikulopłytek przeprowadzono z wykorzystaniem programu FACS Diva (ryc. 1).

### Określenie powtarzalności metody oznaczania liczby retikulopłytek

Oznaczenia powtarzalności badania liczby RP przeprowadzono na próbkach krwi pobranych od 3 zdrowych osób. Od każdego z dawców pobrano



**Rycina 1.** Przykład analizy cytometrycznej RP u zdrowego dawcy krwi (6% RP — górne, prawe pole); podwójne znakowanie: FL1 — oranż tiazolu, FL2 — anti-CD41 sprzężone z fikoerytryną

**Figure 1.** Example of flow cytometric analysis in healthy blood donor (6% RP — upper, right field); double staining: FL1 — thiazole orange, FL2- anti-CD41 conjugated with phycoerythrin

jednorazowo 10 próbek krwi i wykonano równoczesne oznaczenie liczby RP ze wszystkich pobranych próbek. Powtarzalność metody na podstawie oznaczenia odsetka RP została wyrażona jako współczynnik zmienności (CV, *coefficient of variation*).

### Określenie norm hematologicznych odsetka/wartości bezwzględnej retikulopłytek u zdrowych osób

Normy hematologiczne wyrażone w procentach oraz w wartościach bezwzględnych opracowano na podstawie analizy liczby RP u 123 losowo wybranych zdrowych osób (91 mężczyzn, 32 kobiet). Wartości bezwzględne wyliczono na podstawie wzoru: (liczba płytek krwi [ $10^3/\mu\text{l}$ ]  $\times$  wartość RP [%])/100.

### Ocena liczby retikulopłytek w odstępie średnio 3 miesięcy

Oznaczenie liczby RP wykonano u 34 zdrowych osób (25 mężczyzn, 9 kobiet).

### Porównanie wyników badania liczby retikulopłytek przechowywanych w różnych warunkach

Odsetek retikulopłytek oceniono z próbek krwi izolowanych i utrwalonych:

- w dniu pobrania krwi (41 mężczyźni, 14 kobiet); tę grupę nazwano w pracy „grupą kontrolną”, ponieważ odpowiadała ona standardowemu oznaczeniu RP przyjętemu w IHiT;
- w dniu pobrania krwi, a następnie przechowywanych przez 24 godziny w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  (24 mężczyźni, 6 kobiet); retikulopłytki przechowywano w płynie o składzie: 3% BSA, PBS bez jonów Mg i Ca, 0,1M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  bufor o pH 7,2;
- po 24 godzinach przechowywania pełnej krwi w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  od chwili pobrania (17 mężczyzn, 8 kobiet).

### Opracowanie wyników i analiza statystyczna

Wyniki opracowano i poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Microsoft Excel.

## Wyniki

### Określenie powtarzalności metody oznaczania liczby retikulopłytek

Ocena powtarzalności metody została wykonana zgodnie ze schematem podanym przez Chaoui i wsp. [9]. Otrzymany przez autorki niniejszego artykułu współczynnik zmienności (średnio 24,67%) pokazuje, że zastosowana metoda wykonywania badań charakteryzuje się dość dobrą powtarzalnością,

**Tabela 1.** Powtarzalność metody oznaczania odsetka retikulopłytek**Table 1.** Reproducibility of the reticulated platelets percentage determination method

Próbka	Liczba płytek krwi	RP (%) średnia ± SD	CV (%)
Dawca I	256	1,65 ± 0,4	24,05
Dawca II	204	2,26 ± 0,4	20,37
Dawca III	397	3,87 ± 1,14	29,59

RP (reticulated platelets) — retikulopłytki; CV (coefficient of variation) — współczynnik zmienności

co jednak nie wyklucza występowania przypadków pojawiania się wartości skrajnych. Wyniki oceny przedstawiono w tabeli 1.

### Określenie norm hematologicznych liczby retikulopłytek u osób zdrowych

Norma hematologiczna dla retikulopłytek oznaczanych z próbek pełnej krwi, w dniu jej pobrania wyniosła w procentach:  $1,3 \pm 0,8\%$ , w wartościach bezwzględnych:  $3,29 \pm 2,02 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Ze względu na właściwości osobnicze, zakres wartości prawidłowych jest szerszy niż norma hematologiczna i mieści się w następującym przedziale, w procentach: 0,5–6%, w wartościach bezwzględnych:  $1,26\text{--}15,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ .

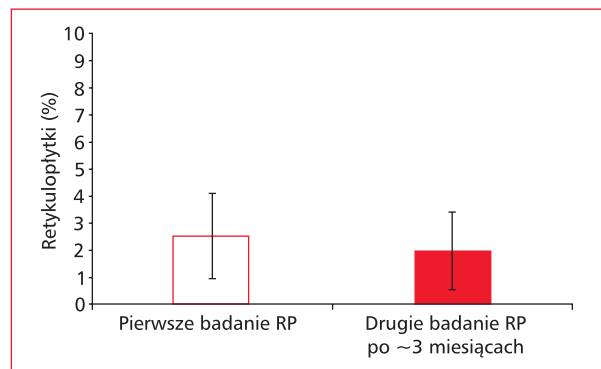
Do chwili obecnej nie została ustalona międzynarodowa procedura badania RP, czego konsekwencją jest brak ujednoczonych norm hematologicznych. W tabeli 2 przedstawiono zamieszczone w literaturze wartości RP odnotowywane u zdrowych osób (0,2–12%).

Po porównaniu otrzymanej przez autorki pracy normy hematologicznej z wartościami RP podawanymi w literaturze (tab. 2) okazuje się, że są one bardzo zbliżone do tych podanych przez Catani i wsp. [10] oraz Gyongyossy i wsp. [8], mimo że procedury znakowania RP podawane przez tych autorów nieco się różnią. Autorzy pierwszej z przytoczonych prac stosowali izolowane RP, natomiast autorzy drugiej pracy stosowali procedurę oznaczania RP z pełnej krwi. W obu pracach stosowano pojedyncze znakowanie oranżem tiazolu, a badania odczytywano w cytometrze przepływowym. Warto zwrócić uwagę na fakt, że również Yamaoka i wsp. [11] oraz Briggs i wsp. [12], którzy do badania odsetka RP używali specjalistycznych analizatorów hematologicznych, przedstawili wartości prawidłowe RP zbliżone do opracowanych przez autorki niniejszej pracy norm hematologicznych.

**Tabela 2.** Odsetek retikulopłytek u zdrowych osób na podstawie danych z literatury**Table 2.** Reticulated platelets percentage in healthy persons, literature data

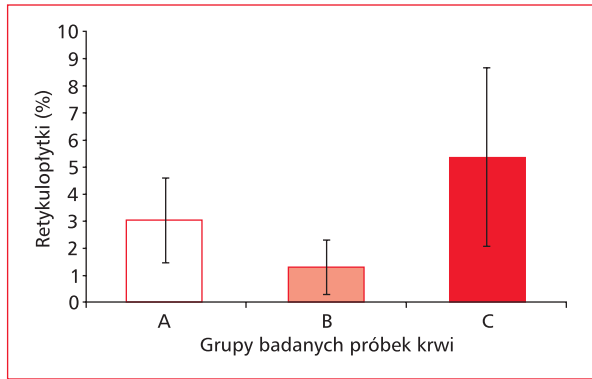
Autorzy publikacji	Zakres wartości RP (%) (średnia ± SD)
Consolini i wsp. [13]	0,2–1,0
Peck-Radosavljevic i wsp. [14]	0,2–3,2
Gyongyossy-Issa i wsp. [8]	0,38–3,24 (1,8 ± 0,9)
Catani i wsp. [10]	0,6–1,8
Yamaoka i wsp. [11]	0,7–7,3
Briggs i wsp. [12]	1,1–6,1
Himmelfarb i wsp. [15]	(2,77 ± 0,17)
Wang i wsp. [16]	3,4–17,0 (10,2 ± 3,4)
Chaoui i wsp. [9]	(7 ± 2,5)
Diquattro i wsp. [17]	5,0–12,8
Kurata i wsp. [18]	(7,7 ± 2,7)

RP (reticulated platelets) — retikulopłytki; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

**Rycina 2.** Odsetek retikulopłytek (RP) w próbkach krwi pobranych od poszczególnych osób w odstępie czasu średnio 3 miesięcy (n = 34)**Figure 2.** Reticulated platelets (RP) percentage in blood samples collected from individual persons after 3 months (n = 34)

### Ocena liczby retikulopłytek w odstępie czasu średnio 3 miesięcy

Na rycinie 2 przedstawiono wyniki badania odsetka RP u 34 zdrowych osób badanych w odstępie 3 miesięcy czasu. Średnia wartość RP w pierwszym badaniu wynosiła  $2,52 \pm 1,58\%$ , a po upływie średnio 3 miesięcy  $1,98 \pm 1,43\%$ . Różnica pomiędzy obydwoma wartościami uzyskanymi w odstępie czasu nie była istotna statystycznie. Oznacza to, że u przebadanych osób odsetek retikulopłytek utrzymuje się w ciągu tego okresu na stałym fizjologicznym poziomie.



**Rycina 3.** Odsetek retikulopłytek (RP) w próbkach krwi: A/RP izolowane w dniu pobrania krwi (grupa kontrolna) (n = 55), B/RP izolowane w dniu pobrania krwi i przechowywane przez 24 h w temperaturze 4°C (n = 30), C/RP izolowane z próbek krwi po 24 h ich przechowywania w temperaturze 4°C (n = 25)

**Figure 3.** Reticulated platelets (RP) percentage in blood samples: A/RP isolated on sample collection day (control group) (n = 55), B/RP isolated on sample collection day and stored for 24 h at 4°C (n = 30), C/RP isolated from blood samples after 24 h storage at 4°C (n = 25)

Zaobserwowano, że u niektórych osób wielokrotnie oddających krew zdarza się odnotowywać wartości odsetka RP znacznie wykraczające poza zakres wartości prawidłowych, co mogło być związane z harmonogramem oddawania przez te osoby krwi w punktach krwiodawstwa (dane niezamieszczone w pracy). U tych osób obserwowano podwyższony poziom fizjologiczny retikulopłytek, czego przyczyną jest fakt adaptacji organizmu do wielokrotnego ubytku krwi podczas jej cyklicznego oddawania w centrach krwiodawstwa [8].

### Ocena przydatności badania retikulopłytek przechowywanych w różnych warunkach

Odsetek RP badanych w dniu pobrania próbek krwi, w porównaniu z liczbą RP po 24 h różnie przechowywanych próbek krwi przedstawiono na rycinie 3. Średnia wartość RP wynosiła w grupie kontrolnej A —  $3,03 \pm 1,57\%$ , natomiast w grupach próbek krwi przechowywanych: w grupie B —  $1,29 \pm 1,01\%$ , a w grupie C —  $5,38 \pm 3,3\%$ . W porównaniu z poziomem RP w grupie kontrolnej zaobserwowano istotny spadek odsetka RP w próbkach krwi izolowanych w dniu badania i przechowywanych przez 24 godziny ( $p < 0,01$ ), natomiast istotny wzrost odsetka retikulopłytek w próbkach RP izolowanych z pełnej krwi, którą uprzednio przechowywano przez 24 godziny ( $p < 0,05$ ).

Przeprowadzone przez autorki pracy doświadczenia wykazały, że przechowywanie próbek pełnej krwi czy wyizolowanych i utrwalonych RP wpływa na zafałszowanie wyniku badania liczby RP. Spadek odsetka RP w grupie B może być tłumaczony niestabilnością mRNA, które w trakcie izolacji podlega szybkiemu trawieniu przez obecne w środowisku badania RNAzy. Natomiast wzrost odsetka RP w przechowywanych próbkach pełnej krwi (grupa C) może być związany z rozpadem komórek w wyniku starzenia się próbek krwi. Podobne obserwacje przedstawiono w pracy Osei-Bimpong [5], którego wyniki badań także pokazują wzrost wartości RP oznaczanych w próbkach pełnej krwi przechowywanych w 4°C przez 24 h. W cytowanej wyżej pracy autor podaje, że wzrost wartości RP jest najprawdopodobniej związany z dezintegracją struktury leukocytów, której następstwem jest uwalnianie RNA przez pory w błonie jądrowej, co wpływa na fałszywie zawyżone wartości RP.

Uzyskane przez autorki niniejszego artykułu wyniki badań oraz obserwacje Osei-Bimpong [5] potwierdzają konieczność wykonywania oznaczenia liczby RP ze świeżo pobranych próbek krwi, zgodnie z procedurą dotychczas stosowaną. Wobec tego oznaczanie odsetka RP z przechowywanych przez 24 godziny próbek pełnej krwi lub z izolowanych i utrwalonych RP dają na tyle fałszywe wyniki, że nie mogą być brane pod uwagę w formułowaniu diagnozy lekarskiej i planowaniu leczenia.

### Wnioski

Norma hematologiczna oraz zakres wartości prawidłowych RP u zdrowych osób ustalone w toku przeprowadzonych badań wynoszą odpowiednio, w procentach:  $1,3 \pm 0,8\%$ ,  $0,5\text{--}6\%$ , w wartościach bezwzględnych:  $3,29 \pm 2,02 \times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $1,26\text{--}15,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ .

Stosowana przez autorki niniejszej pracy metoda do rutynowego oznaczania liczby RP odznacza się dobrą powtarzalnością.

Odsetek RP, badany średnio w odstępie 3 miesięcy, nie podlega istotnym wahaniom.

Liczbę RP powinno się oznaczać z próbki krwi pobranej w dniu badania.

### Piśmiennictwo

1. Janicki K. Układ megakariocytotwórczy. Janicki K. Hematologia. Piotrowska R. (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001: 28–29.
2. Michur H. Retikulopłytki i ich znaczenie kliniczne. Acta Haematol. Pol. 2006; 37 (4): 519–523.

3. Monteagudo M., Amengual M.J., Munoz L., Soler J.A., Roig I., Tolosa C. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *Q. J. Med.* 2008; 101: 549–555.
4. Michur H., Maślanka K., Szczepiński A., Mariańska B. Reticulated platelets as a marker of platelet recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2008; 30: 519–525.
5. Osei-Bimpong A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. *Hematol.* 2009; 14: 118–121.
6. Thomas-Kaskel A.-K., Mattern D., Köhler G., Finke J., Behringer D. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2007; 72B: 241–248.
7. Kienast J., Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75: 116–121.
8. Gyongyossy-Issa M.I.C., Miranda J., Devine D. V. Generation of reticulated platelets in response to whole blood donation or plateletpheresis. *Transfusion* 2001; 41: 1234–1240.
9. Chaoui D., Chakroun T., Robert F. i wsp. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* 2005; 45: 766–772.
10. Catani L., Vianelli N., Luatti S. i wsp. Characterization of autotransplant-related thrombocytopenia by evaluation of glyco-calicin and reticulated platelets. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24: 1191–1194.
11. Yamaoka G., Kubota Y., Nomura T. i wsp. The immature platelet fraction is useful marker for predicting the timing of platelet recovery in patients with cancer after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2010, [nr, strong](#).
12. Briggs C., Kunka S., Hart D., Oguni S., Machin S.J. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 2004; 126: 93–99.
13. Consolini R., Calleri A., Bengala C., Legitimo A., Conte P.F. Evaluation of thrombopoiesis kinetics by measurement of reticulated platelets and CD34<sup>+</sup> cell subsets in patients with solid tumors following high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell support. *Haematologica* 2001; 86: 959–964.
14. Peck-Radosavljevic M., Wichlas M., Zacherl J. i wsp. Thrombopoietin induces rapid resolution of thrombocytopenia after orthotopic liver transplantation through increased platelet production. *Blood* 2000; 95: 795–801.
15. Himmelfarb J., Holbrook D., McMonagle E., Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kidney Int.* 1997; 51: 834–839.
16. Wang C., Smith B.R., Ault K.A., Rinder H.M. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 2002; 42: 368–374.
17. Diquattro M., Gagliano F., Calabrò G.M. i wsp. Relationships between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2009; 31: 199–206.
18. Kurata Y., Hayashi S., Kiyoi T. i wsp. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glyco-calicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am. J. Clin.* 2001; 115: 656–664.