

# SEED Hematologia



## Retikulocyty i ich znaczenie

### Wytwarzanie retikulocytów

Wszystkie komórki krwi pochodzą z komórek macierzystych. W czasie proliferacji różnicują się do komórek trzech linii komórkowych (erytropoeza, granulopoeza i trombopoeza). Żywotność krążących krwinek czerwonych (RBC) wynosi około 120 dni. W czasie jednej doby prawie 1% ogólnej liczby czerwonych krwinek zostaje utraconych i uzupełnionych przez nowe komórki. W każdej sekundzie produkowanych jest około dwóch milionów krwinek czerwonych. W szpiku kostnym młode erytroblasty ortochromatyczne pozbywają się jądra komórkowego i stając się retikulocytami przechodzą do krwiobiegu.

Z reguły retikulocyty pozostają w szpiku kostnym przez trzy dni, a we krwi obwodowej są obecne przez jeden dzień. Nazwa "retikulocyt" pochodzi od struktury podobnej do siateczki, która staje się widoczna po barwieniu przyżyciowymi barwnikami takimi jak błękit brylantowo-krezolowy lub błękit metylenowy (strącanie fragmentów kwasu rybonukleinowego; ryc. 1). Poprzez usunięcie retikulum endoplazmatycznego, retikulocyt w ciągu czterech dni rozwija się w dojrzałą krwinkę czerwoną.

### Historia

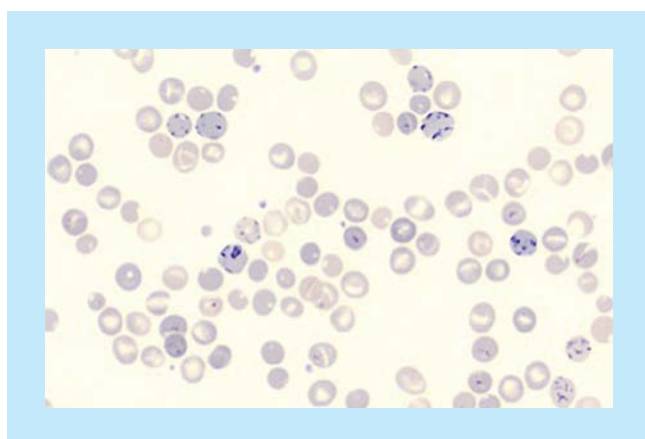
- Erb odkrywa siateczkę wewnątrzkomórkową z użyciem kwasu pikrynowego – pierwszy opis retikulocytów, rok 1865.
- Ehrlich wykorzystuje barwienie przyżyciowe do pokazania sieci wewnątrzkomórkowej *substantia reticulo-filamentosa*, rok 1881.
- Smith opisuje retikulocyty jako niedojrzałe krwinki czerwone, rok 1891.
- Heilmeyer klasyfikuje etapy dojrzewania, rok 1932 (tabela 1).
- Seip wyznacza zakresy referencyjne etapów dojrzewania, rok 1953 (tabela 1).
- Zliczanie retikulocytów za pomocą metod opartych na fluorescencji (oranż akrydynowy), opracowane przez Kosenov i Mai, rok 1960.
- Tanke automatyzuje pomiar retikulocytów za pomocą fluorescencji i cytometrii przepływowej, rok 1983.

Tabla 1 Stadia dojrzewania retikulocytów

Stadium dojrzewania wg Heilmeyera	Opis morfologiczny	Kwantyfikacja wg Seipa (prawidłowo %)
Stadium 0	Jądro	
Stadium I	Zwarte retikulum	< 0,1
Stadium II	Luźne retikulum	7,0
Stadium III	Rozproszone retikulum	32,0
Stadium IV	Niewiele rozproszonych ziarnistości	61,0

I i IV etap dojrzewania często są błędnie interpretowane – zdarza się, że etap I zostaje opisany jako erytoblast, a stadium IV jako dojrzała krwinka czerwona, ponieważ niska zawartość RNA nie jest wykrywana. Prawidłowa interpretacja stadium IV jest szczególnie ważna, gdyż ten etap dojrzewania dominuje we krwi obwodowej.

W 1986 roku National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) zdefiniował retikulocyt, jako: „niezawierającą jądra krwinkę czerwoną, która posiada co najmniej dwie lub więcej "kropek" z niebiesko zabarwionym materiałem odpowiadającym rybosomalnemu RNA [1].” Międzynarodowa Rada ds. Standaryzacji w Hematologii (International Council for Standardization in Haematology, ICSH) również zaakceptowała tę definicję [2].



Ryc. 1 Retikulocyty w różnych stadiach dojrzałości, barwienie przyżyciowe

Retikulocyty odzwierciedlają regenerację erytropoezy. W zrównoważonym układzie ponad 90 % retikulocytów w końcowych stadiach dojrzałości (faza III i IV) znajduje się we krwi obwodowej.

Im wcześniej pobudzana jest erytropoeza tym wcześniej retikulocyty, o niższym stadium dojrzewania, przechodzą do krwi obwodowej (podobnie do "przesunięcia w lewo" w granulopoezie).

## Liczba retikulocytów

Prawidłowy odsetek retikulocytów we krwi zależy od stanu klinicznego pacjenta, ale zazwyczaj wynosi od 0,5 % do 1,5 % u osób dorosłych [3] i od 2 % do 6 % u noworodków [4]. Liczba retikulocytów stanowi dobry marker aktywności szpiku, ponieważ odzwierciedla aktualne wytwarzanie i status erytropoezy. W artykule opublikowanym przez Piva et al. [5] przedstawione zostało porównanie różnorodnych zakresów referencyjnych sugerowanych przez różnych autorów

### Wskazania do pomiaru retikulocytów

- Podstawowa diagnostyka we wszystkich rodzajach niedokrwistości.
- Terapia monitorowana suplementacji żelaza, witaminy B12 i kwasu foliowego.
- Monitorowanie terapii w czasie podawania erytropoetyny.
- Monitorowanie podczas transplantacji komórek macierzystych.
- Pacjenci pediatryczni oraz noworodki.

Ustalenie liczby retikulocytów z krwi pobranej na EDTA jest wiarygodne do 72 godzin po pobraniu próbki krwi. Temperatura przechowywania +4 °C lub +20 °C, nie ma znaczącego wpływu na wynik pomiaru [6].

## Zliczanie manualne

Materiały: barwnik przyżyciowy np. błękit brylantowo-krezolowy lub błękit metylenowy, szkiełko mikroskopowe, mikroskop.

1. Krew wymieszać z równą objętością barwnika przyżyciowego.
2. Po inkubacji, próbkę należy rozmasać na szkiełku mikroskopowym i wysuszyć na powietrzu.
3. Retikulocyty należy zliczać pod mikroskopem przy 1000-krotnym powiększeniu (obiektyw imersyjny).
4. Zliczanych jest 1000 krwinek czerwonych. Przy 1000-krotnym powiększeniu odpowiada to około pięciu polom widzenia, każde składa się z około 200 komórek.
5. Liczba retikulocytów podawana jest w promilach [‰] lub w procentach [%].

Cytowany w literaturze poziom błędu liczenia ręcznego wynosi od 25 do 50% CV [7, 8] lub więcej, w zależności od liczby retikulocytów. Rutynowo zalecane jest liczenie 1000 komórek. Zgodnie z zaleceniem ICSH (1990) [9] w sprawie zliczania retikulocytów, będących w zakresie referencyjnym, należy zliczyć co najmniej 4000 komórek, aby uniknąć przekroczenia błędu statystycznego w wysokości 5% (tabela 2).

**Tabla 2** Wpływ liczby zliczonych RBC na błąd statystyczny w zliczaniu retikulocytów. Podane wartości odpowiadają CV 5%.

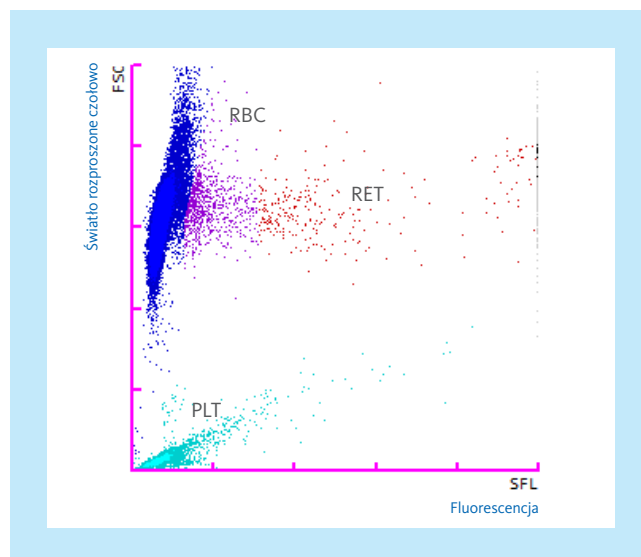
Wartość retikulocytów we krwi (%)	Liczba komórek, które należy zliczyć, aby uzyskać CV = 5 %
1	39 600
2	19 600
5	7 600
10	3 600
20	1 600
50	400

## Zliczanie automatyczne

Do dokładnego pomiaru retikulocytów, analizatory automatyczne wykorzystują kombinację pobudzenia laserem, czujników i markerów fluorescencyjnych, które znakują RNA i DNA (takie jak oranż tiazolu lub polimetyny) [10].

W celu pomiaru retikulocytów, próbka jest inkubowana z barwnikiem fluorescencyjnym, który wiąże się z RNA. Retikulocyty zliczane są za pomocą cytometrii przepływowej. Zautomatyzowane zliczanie retikulocytów pozwala na obiektywną klasyfikację

komórek i zapewnia wysoki poziom powtarzalności wyników. W zliczaniu automatycznym liczba ocenianych krwinek czerwonych waha się od 10 000 do 30 000. W porównaniu do metody manualnej daje to zarówno wysoki poziom zliczania (ryc. 2), jak i wysoki stopień precyzji, w czasie krótszym niż jedna minuta.



**Ryc. 2** Skatergram z kanału RET (RBC: dojrzałe krwinki czerwone; RET: retikulocyty; PLT: płytki krwi zmierzone optycznie)

## Znaczenie kliniczne liczby retikulocytów

Interpretacja liczby retikulocytów jest problematyczna w przypadku ciężkich niedokrwistości. Umiarkowany wzrost względnej liczby retikulocytów w ciężkich niedokrwistościach nie wskazuje na wystarczająco silną regenerację erytropoezy, lecz jedynie na skróconą żywotność czerwonych krwinek. Preferowane jest raportowanie bezwzględnego stężenia retikulocytów, jako liczby retikulocytów/ $\mu$ l, ponieważ zapewnia to bezpośredni pomiar wydajności erytropoezy.

Przykład: Wartość 20‰ retikulocytów uważana jest za wzrost. Jednakże w ciężkiej niedokrwistości, z liczbą krwinek czerwonych wynoszącą na przykład dwa miliony, 20‰ retikulocytów stanowi jedynie 40 000 retikulocytów/ $\mu$ l, czyli wartość w zakresie referencyjnym.

Wartość względna retikulocytów (‰ i %) opisuje żywotność krwinek czerwonych, podczas gdy stężenie komórek (retikulocytów/ $\mu$ l) wskazuje na wydajność erytropoezy.

Przeliczenie wartości względnej (%) na stężenie retikulocytów

RET# (RET x  $10^6$ / $\mu$ l):

$$\frac{\text{RET [\%]} \times \text{RBC [10}^6\text{/}\mu\text{l]}}{100} = \text{RET [10}^6\text{/}\mu\text{l]}$$

Zakresy referencyjne wyrażone w wartościach względnych i bezwzględnych według Cavill i wsp. [6] prezentują się następująco:

Wartości względne: m/k 0,43 – 1,36 %  
 Wartości bezwzględne: k 17,0 – 63,8 x 10<sup>9</sup>/l  
 m 23,0 – 70,1 x 10<sup>9</sup>/l

Należy pamiętać, że publikowane zakresy referencyjne mogą być wykorzystane dla różnych rodzajów analizatorów pod warunkiem, że zostały one zweryfikowane, ponieważ istnieją różnice między zakresami referencyjnymi zależne od danej populacji. Każde laboratorium powinno ocenić, które z publikowanych zakresów są najbardziej odpowiednie dla ich pacjentów.

## Parametry związane z retikulocytami

### Index retikulocytów (RI)

Wartość względna (% , ‰) retikulocytów może wzrosnąć, jeśli faktycznie zwiększona jest liczba retikulocytów lub zmniejszona została liczba krwinek czerwonych. Korekta tej wartości może być wykonana z wykorzystaniem hematokrytu pacjenta w odniesieniu do prawidłowego hematokrytu 0,45 [l/l]. Poniższy typ korekcji zalecany jest w przypadku niedokrwistości:

$$RI = \frac{RET [\%] \times HCT [l/l]}{0,45 [l/l] (HCT wzorcowy)}$$

### Indeks produkcji retikulocytów (RPI)

RPI jest indeksem, który pozwala na ocenę skuteczności erytropoezy, a tym samym wydajności szpiku kostnego. Fizjologiczne dojrzewanie retikulocytów dzieli się na dojrzewanie w szpiku kostnym (8–10 dni licząc od pierwszego podziału proerytroblastu) i dojrzewanie we krwi obwodowej (1–2 dni).

Zadaniem RPI jest ocena czy szpik kostny wykazuje wystarczającą odpowiedź w stanie niedokrwistości. Po znacznym krwawieniu, produkcja retikulocytów powinna wzrosnąć w ciągu 2–3 dni w odpowiedzi na utratę RBC i osiągnąć maksimum między 6, a 10 dniem [11]. Jeśli tak się nie dzieje, może to wskazywać na zaburzenie procesu erytropoezy w szpiku.

W przypadku znacznej produkcji krwinek czerwonych, retikulocyty przechodzą do krwi obwodowej będąc we wcześniejszej fazie i tam dojrzewają (zmieniony czas przebywania we krwi obwodowej nazywany jest „przesunięciem”). Prowadzi to do wyraźnego wzrostu retikulocytów w krwiobiegu, ale nie świadczy o wydajniejszej erytropoezie. Czas dojrzewania retikulocytów w szpiku kostnym jest proporcjonalny do hematokrytu – im niższy hematokryt, tym krótszy czas przebywania retikulocytów w szpiku, a dłuższy we krwi. Aby określić wydajność szpiku kostnego, ilość retikulocytów jest korygowana przez współczynnik zależny od hematokrytu (RPI).

**Tabla 3** Czas dojrzewania retikulocytów we krwi obwodowej w zależności od hematokrytu

Haematokryt	Czas przebywania retikulocytów we krwi = korekta dojrzewania
36 – 45 %	1 dzień
26 – 35 %	1,5 dnia
16 – 25 %	2 dni
15 % i poniżej	2,5 dnia

RPI u zdrowych osób powinien mieścić się w zakresie 0,5% – 2,5% [11]. W przypadku anemii RPI poniżej 2% wskazuje na niewystarczającą produkcję retikulocytów. Natomiast RPI powyżej 3% wskazuje na wystarczającą kompensację utraty krwinek czerwonych [12].

$$RPI = \frac{RET [\%]}{\text{Czas dojrzewania RET we krwi w dniach}} \times \frac{HCT [l/l] (\text{pacjent})}{0,45 (HCT wzorcowy)}$$

#### Przykład

Wynik pacjenta: HCT= 0,25 l/l, retikulocyty = 20 [%]

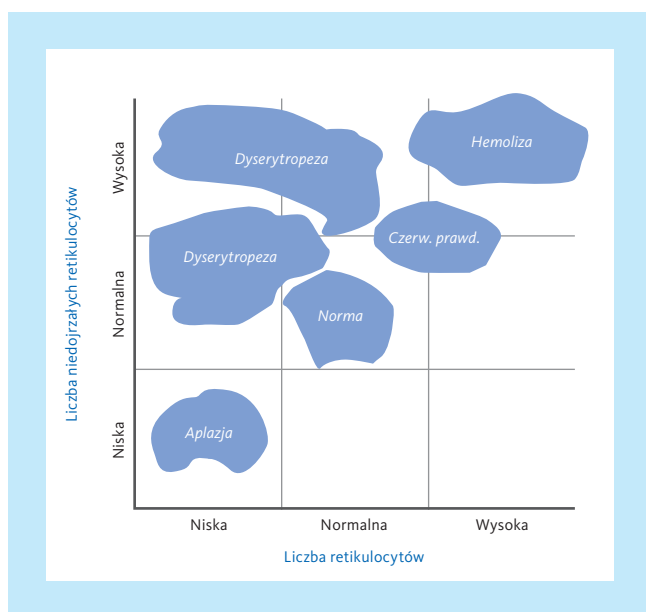
$$RPI = \frac{20 [\%]}{2} \times \frac{0,25}{0,45} = 5,5$$

### Frakcja niedojrzałych retikulocytów (IRF)

Wartość IRF jest wczesnym markerem oceny regeneracji erytropoezy. Liczba retikulocytów zwiększa się po 2–3 dniach, podczas gdy wartość IRF wzrasta zaledwie po kilku godzinach. Jeśli wartość IRF nie zwiększa się podczas leczenia niedokrwistości niedoborowych (erytropoetyną lub witaminami) wskazuje to na brak reakcji na leczenie. Ponadto pomaga sklasyfikować anemie hipo-, normo- i hiperregeneratywne.

Wartość IRF i liczba retikulocytów sprawdziły się w monitorowaniu przeszczepu szpiku kostnego i komórek macierzystych. W udanych przeszczepach, w 80% przypadków, wartość IRF osiągnie wartość 5% wcześniej niż granulocyty ich klasyczny próg 0,5 x 10<sup>9</sup> granulocytów/l [13].

Przykładowe zastosowanie przedstawione jest na ryc. 3, w której różne patologie charakteryzują się różną wartością dojrzałych i niedojrzałych retikulocytów. Na przykład w aplazji zarówno liczba niedojrzałych retikulocytów (IRF), jak i całkowita liczba retikulocytów jest niska. Ten rodzaj anemii dotyczy prekursorów krwinek. Szpik kostny nie wytwarza krwinek czerwonych, dlatego nie ma ani dojrzałych, ani niedojrzałych retikulocytów. Zakres referencyjny dla IRF wynosi 1,6 – 10,5% dla kobiet i mężczyzn [14].



Ryc. 3 Znaczenie retikulocytów w diagnostyce klinicznej

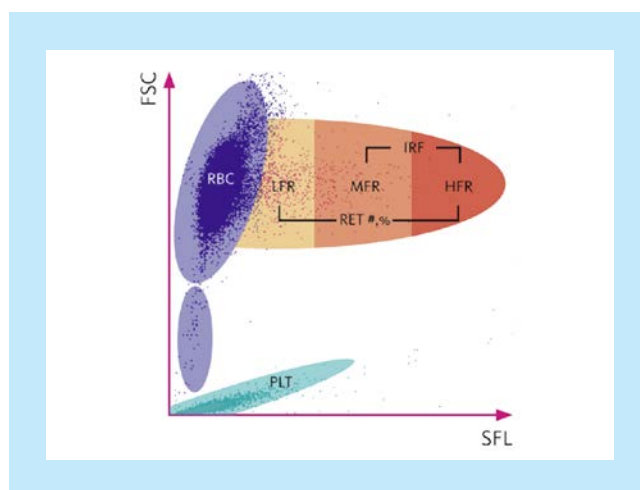
### Dojrzewanie retikulocytów

Oprócz konwencjonalnego pomiaru retikulocytów, fluorescencyjna cytometria przepływowa pozwala na klasyfikację retikulocytów na trzy etapy dojrzewania, które są zdefiniowane poprzez zawartość RNA (czyli intensywność fluorescencji) w retikulocytach. Im wyższa zawartość RNA, tym mniej dojrzały jest retikulocyt.

Retikulocyty dzielone są na 3 frakcje. Kryterium ich podziału jest intensywność fluorescencji, która odzwierciedla poszczególne stadia dojrzewania (tabela 4):

- LFR (low-fluorescence reticulocytes) – „dojrzałe” retikulocyty
- MFR (medium-fluorescence reticulocytes) – „średnio-dojrzałe” retikulocyty
- HFR (high-fluorescence reticulocytes) – “niedojrzałe” retikulocyty

IRF jest sumą MFR i HFR i stanowi wskaźnik dojrzałości retikulocytów.  
 $IRF = MFR + HFR$



Ryc. 4 Skatergram z kanału retikulocytarnego

Tabela 4 Stadia dojrzałości retikulocytów

LFR	MFR	HFR
Retikulocyty o niskiej fluorescencji	Retikulocyty o pośredniej fluorescencji	Retikulocyty o wysokiej fluorescencji
Niewielka zawartość RNA	Większa zawartość RNA	Wysoka zawartość RNA
Dojrzałe retikulocyty	Średnio-dojrzałe retikulocyty	Niedojrzałe retikulocyty
Zakres referencyjny: 86,5 – 98,5%	Zakres referencyjny: 1,5 – 11,5%	Zakres referencyjny: 0 – 1,4%

### Ekwiwalent hemoglobiny w retikulocytach (RET-H<sub>e</sub>)

Oprócz ilościowej oceny parametrów morfologii krwi (RBC HGB, RET#/% , IRF, MCV), RET-H<sub>e</sub> umożliwia ocenę jakościową. Krwinki czerwone wykazują 120-dniowy okres przeżywalności. Z tego powodu wykorzystanie ich do wykrywania niedoborów żelaza i zmian statusu dostępności żelaza w procesie erytropoezy jest możliwe tylko po relatywnie długim czasie. RET-H<sub>e</sub> (ekwiwalent hemoglobiny w retikulocytach) pokazuje zawartość HGB w świeżo produkowanych czerwonych krwinkach, a tym samym zapewnia w czasie rzeczywistym informacje na temat podaży żelaza do erytropoezy.

Pomiar zawartości hemoglobiny w retikulocytach oznacza możliwość oceny dostępności żelaza dla potrzeb erytropoezy i oceny jakości nowo produkowanych krwinek czerwonych. Pozwala na wykrycie zmian poziomu hemoglobiny znacznie wcześniej niż pomiar zawartości hemoglobiny w dojrzałych krwinkach czerwonych.

Oznaczenie RET-H<sub>e</sub> może być przeprowadzone na analizatorze hematologicznym wspólnie z rutynowymi parametrami krwi

obwodowej. Główną zaletę parametru RET-H<sub>e</sub> w odniesieniu do ferrytyny i transferyny stanowi fakt, że jest on niezależny od stanu ostrej fazy. Poziom tych standardowych markerów biochemicznych zostaje drastycznie zaburzony np. w stanach zapalnych, ciąży lub w przypadku występowania wielu innych ciężkich zaburzeń. Z tego powodu kliniczna interpretacja ich wyników może być trudna lub wręcz niemożliwa.

Użyteczność kliniczna RET-H<sub>e</sub> została udowodniona i jest obecnie powszechnie stosowanym parametrem w zaawansowanej diagnostyce klinicznej.

### Wskazania

- Klasyfikacja anemii normochromicznych i hipochromicznych.
- Monitorowanie terapii przewlekłych zakażeń i nowotworów.
- Monitorowanie terapii erytropoetyną i suplementacji żelazem.
- Określanie aktualnego statusu żelaza.
- Różnicowanie między niedokrwistością z niedoboru żelaza i funkcjonalnym niedoborem żelaza.
- Wczesny marker choroby. Wspólnie z RET# pozwala na określenie zarówno ilości, jak i jakości nowych RBC.

Zakresy referencyjne RET-H<sub>e</sub> wynoszą [14] (dla kobiet i mężczyzn): 1,996 – 2,407 fmol lub 32,1 – 38,8 pg.

RET-H<sub>e</sub> dostarcza informacje na temat aktualnej biodostępności żelaza – niskie wartości oznaczają brak żelaza lub niedostępność żelaza dla procesu erythropoezy. Często parametr ten stosowany jest wspólnie z ferrytyną – wysoka lub prawidłowa wartość ferrytyny przy niskiej wartości RET-H<sub>e</sub> sugeruje klasyczny niedobór żelaza. Ponieważ ferrytyna jest fałszywie podwyższona w czasie ostrej fazy, należy wykluczyć zapalenie, np. poprzez sprawdzenie CRP.

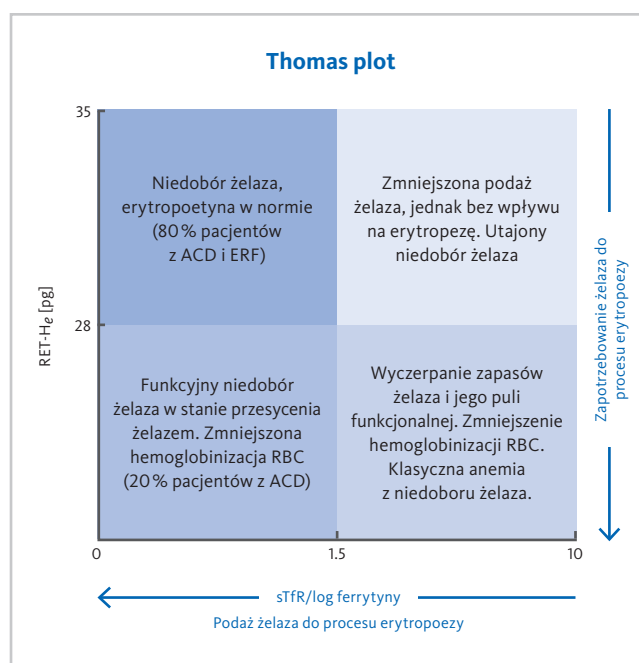
RET-H<sub>e</sub> wykorzystuje się w monitorowaniu terapii erytropoetyną i/lub IV terapii żelazem. Jeśli wartość wzrasta, wskazuje to na pozytywną odpowiedź.

### Diagram Thomasa

W 2006 Thomas i wsp. stworzyli diagram pomocny w różnicowaniu stanów niedoboru żelaza i identyfikowania pacjentów, u których wystąpi odpowiedź na terapię erytropoetyną [15]. Gospodarka żelazem w naszym organizmie jest regulowana przez obecny stopień

erythropoezy i ilość zapasów żelaza. Zależność pomiędzy zawartością wbudowanej hemoglobiny (RET-H<sub>e</sub>), a zapasami żelaza może zostać przedstawiona na schemacie diagnostycznym. Tak zwany „Diagram Thomasa” (Thomas-Plot) pozwala na rozróżnienie klasycznego niedoboru żelaza od anemii chorób przewlekłych. Diagram ten ukazuje korelację pomiędzy stosunkiem sTfR/log ferrytyny (wskaźnik ferrytyny, który jest markerem dostępności żelaza w procesie erythropoezy), a RET-H<sub>e</sub> (ryc. 5) [16].

Diagram Thomasa może być wykorzystany w celu monitorowania pacjentów poddawanych leczeniu, aby obserwować jak przesuwa się oni pomiędzy ćwiartkami diagramu.



Ryc. 5 Diagram Thomasa do identyfikacji różnych faz postępującego niedoboru żelaza (ACD: anemia chorób przewlekłych, ERF: schyłkowa niewydolność nerek, IDA: anemia z niedoboru żelaza, ID: klasyczny niedobór żelaza)

### Podsumowanie

Wiarygodna liczba retikulocytów oraz niektóre parametry retikulocytarne (IRF, RPI, etc.) są bardzo ważnym elementem w określeniu czy szpik kostny funkcjonuje prawidłowo w aspekcie produkcji nowych krwinek czerwonych. Jednak równie ważna jest ocena jakościowa, możliwa dzięki parametrowi RET-H<sub>e</sub>, określającemu hemoglobinizację retikulocytów.

Wiarygodna informacja na temat retikulocytów, zarówno ilościowa jak i jakościowa, jest pomocna w diagnostyce różnicowej anemii, jak również w monitorowaniu pacjentów.

## Źródła

- [1] **Koepke et al. (1986):** Reticulocytes. *Clin Lab Haematol* 8, 169 – 179.
- [2] **The Expert Panel on Cytometry of the International Council of Standardization in Haematology. (1992):** ICSH Guidelines for Reticulocyte Counting by Microscopy of Supravivally Stained Preparations. World Health Organization, Geneva.
- [3] **Means RT et al. (2009):** Anemia: *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. Vol. 1: Chapter 26.
- [4] **Lilleyman JJ et al. (1992):** Paediatric Haematology. Churchill Livingstone.
- [5] **Piva E et al. (2010):** Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 48(10):1369 – 1380.
- [6] **Cavill et al. (1996):** In vitro stability of the reticulocyte count. *Clin Lab Haem* 18 Suppl:9 – 11.
- [7] **Peebles DA et al. (1981):** Paediatric Haematology. Churchill Livingstone.
- [8] **Savage RA et al. (1985):** Analytical Inaccuracy and Imprecision of Reticulocyte Counting: A Preliminary Report from the College of American Pathologists Reticulocyte Project. *Blood Cells* 11:97.
- [9] **ICSH Expert Panel on Cytometry. (1998):** Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. *Clin Lab Haematol* 20:77 – 79.
- [10] **Davis BH, Bigelow NC. (1994):** 'Reticulocyte analysis and reticulocyte maturity index'. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA (eds.). *Flow cytometry. Methods in Cell Biology* 42. San Diego: Academic Press. pp. 263 – 274.
- [11] **Hoffbrand AV & Moss PAH. (2011):** *Essential Haematology*, 6th Ed. Wiley and Blackwell; West Sussex, UK.
- [12] **Adamson JW & Longo DL. Anemia and polycythemia.** In: **Braunwald E et al. (2001):** *Harrison's Principles of Internal Medicine* (15th Edition). McGraw Hill (New York).
- [13] **d'Onofrio G et al. (1996):** Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clin Lab Haem* 18(Suppl.1):45 – 53.
- [14] **Pekelharing et al. (2010):** Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex Journal International* Vol. 20, No. 1.
- [15] **Thomas C et al. (2006):** The diagnostic plot: A concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. *Medical Oncology* Volume 23, Issue 1, pp. 23 – 36.
- [16] **Thomas L & Thomas C. (2004):** Biochemical markers and haematologic indices in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis and monitoring of r-HuEPO therapy. *Jugoslav Med Biochem* 23(3):235 – 238.