

# Demir eksikliği anemisinde nötrofil hipersegmentasyonu

## *Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anemia*

Serpil DÜZGÜN, Yıldız YILDIRMAK, Feyzullah ÇETİNKAYA, Günsel KUTLUK, Metin UYSALOL, Merih AKIŞIK, Reyhan YILDIRIM

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. Çocuk Kliniği

### ÖZET

**Amaç:** Nötrofil hipersegmentasyonu, megaloblastik anemilerde beklenen bir periferik yayma bulgusudur. Yapılan araştırmalar demir eksikliği anemisi tesbit edilen hastalarda da nötrofil hipersegmentasyonu olabileceğini göstermiştir. Biz de bu çalışmamızda demir eksikliği anemisi olan, ancak B12 vitamini ve folik asit düzeyleri normal bulunan hastalarda nötrofil hipersegmentasyonu sıklığını araştırdık.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya katılan vakalar (n:123) iki gruba ayrıldı: Grup I demir eksikliği anemili 102 hastayı, kontrol grubu olan Grup II ise sağlıklı 21 hastayı kapsıyordu. Her iki grubun ortalama yaşları ve cinsiyet dağılımları benzerdi.

**Bulgular:** Hipersegmentasyon Grup I'de %30.4, Grup II'de ise %9.5 sıklığında bulundu. Gruplar arasında hipersegmentasyon varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ( $p < 0.05$ ).

**Sonuç:** Bu bulgular bize nötrofil hipersegmentasyonunun izole demir eksikliği anemisi olan hastalarda da görülebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Demir eksikliği, anemi, nötrofil hipersegmentasyonu.

### SUMMARY

**Objective:** Neutrophil hypersegmentation is an expected peripheral blood smear finding in megaloblastic anemias. Clinical reports suggest that neutrophil hypersegmentation may also occur in patients with iron deficiency anemia. In this study we searched presence of neutrophil hypersegmentation in patients with iron deficiency anemia but have normal vitamin B12 and folic acid levels.

**Study Design:** The subjects (n:123) were divided into two groups: the patients with iron deficiency anemia constituted Group I (n:102), and the healthy controls Group II (n:21). The average ages and sexuality of both groups were comparative.

**Results:** Hypersegmentation was found in 30.4 % of Group I and 9.5% of Group II ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** These results show that neutrophil hypersegmentation may also be seen in patients with iron deficiency anemia.

**Key Words:** Iron deficiency, anemia, neutrophil hypersegmentation.

### GİRİŞ

Anemi sebepleri arasında demir eksikliği en sık rastlanılan faktörlerden biridir (1). Ancak, nutrisyonel anemilerden olan B<sub>12</sub> ve folik asit eksikliklerinde görülen nötrofil hipersegmentasyonu (2) demir eksikliği anemisinde mutad olarak beklenen bir bulgu değildir.

Bu çalışmada demir eksikliği anemisi olan, fakat B<sub>12</sub> vitamini ve folik asit düzeyleri normal bulunan hastalarda nötrofil hipersegmentasyonu

nu sıklığı araştırılmış ve sağlıklı çocuklarla karşılaştırılmıştır.

### GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Pediatri Polikliniği'ne başvuran 123 çocukta prospektif olarak yapıldı. Hemogloblin değeri yaşa göre -2SD altında, serum demiri 30 g/dl'nin altında, transferrin saturasyonu %13 altında, ferritin 10 ng/ml altında olan, serum B<sub>12</sub> düzeyi 100 pg/ml, folik asit düzeyi 5 ng/ml üzerinde olan 102 çocuk birinci grubu (çalışma grubu) oluşturdu. Anemi şüphesi ile araştırılan ancak hemogloblin değerleri normal bulunan, başka herhangi bir hastalığı olmayan, yaş ve cinsiyet dağılımı çalışma grubuna uyan 21 çocuk ise ikinci grubu (kontrol grubu) olarak alındı.

### Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Feyzullah ÇETİNKAYA  
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
3. Çocuk Kliniği, İstanbul  
Tel : (0212) 231 22 09 /1351  
Fax : (0212) 240 29 91

**Tablo 1:** Hasta ve kontrol gruplarının bazı örnek laboratuvar bulguları

	Demir eksikliği	Kontrol	P
Hemoglobin (g/dl)	8.73 2.16	12.01 1.16	0,001**
HCT (%) (1)	27.53 5.84	36.27 3.10	0,001**
MCV (fL) (2)	62.60 7.87	78.49 5.72	0,001**
MCH (pg) (3)	19.95 3.47	26.12 2.44	0,001**
MCHC (g/dl) (4)	31.20 2.87	33.21 1.64	0,006**
RDW (%) (5)	18.84 4.68	13.81 1.71	0,001**
Trombosit ( $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	440.04 168.36	350.29 130.04	0,023*
Lökosit ( $\times 10^3 / \mu\text{L}$ )	11.39 5.55	9.53 4.98	0,157
Nötrofil	5.39 3.88	3.98 2.16	0,162
Demir (g/dl)	21.49 13.48	65.00 27.75	0,001**
TDBK (g/dl) (6)	466.95 92.43	327.86 53.79	0,001**
Ferritin (g/ml)	9.80 11.75	37.36 16.92	0,001**
Transferrin saturasyonu	4.52 3.48	19.52 7.26	0,001*
Vit.B12 (pg/ml)	475.94 296.34		
Folik asit (ng/ml)	12.31 4.68		

\*\*p<0,01 ileri düzeyde anlamlı

(1) Hematokrit

(2) Ortalama eritrosit hacmi

(3) Ortalama eritrosit hemoglobini

(4) Ortalama eritrosit hemoglobini konsantrasyonu

(5) Eritrosit dağılım genişliği

(6) Total demir bağlama kapasitesi

Çalışmaya alınan hastalardan ve kontrol grubundan periferik yayma yapıldı. Yaymada 100 nötrofil sayılarak nötrofillerin %5'inden daha fazlasında 5 segment olması veya en az 1 tane altı veya daha fazla segmentli çekirdeği olan nötrofil saptanması nötrofil hipersegmentasyonu olarak tanımlandı (2).

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS for Windows 10.0 programı ile yapıldı. Karşılaştırmalarda Student t testi, Mann Whitney u testi ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. P değeri <0,05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Gruplardaki yaş değeri en küçük 4 ay, en büyük 168 ay olarak saptanmıştır. Yaş ve cinsiyet dağılımları arasında gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p >0,05).

Çalışma grubunun hemoglobin, Hct, MCV, MCH, MCHC düzeyleri kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı derecede düşük bulundu (p<0,01) (Tablo 1).

Çalışma grubunun RDW düzeyi ve trombosit sayısı kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,01).

Çalışma ve kontrol grubunun lökosit ve nötrofil sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p>0,05).

**Tablo 2:** Lop sayısına göre serum ferritin düzeylerinin dağılımı

	Lop	n	Ferritin Ort SD	P
Demir eksikliği	4'lü	73	10,38 12,08	0,252 p>0,05
	5'li	23	9,52 12,00	
	6'lı	6	3,85 1,96	
Kontrol grubu	4'lü	19	37,76 17,36	
	5'li	2	33,75 15,90	

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çalışma grubunun demir düzeyi düşük, demir bağlama kapasitesi yüksek, ferritin düzeyi düşük ve transferrin saturasyonu düşük olup gruplar arasında istatistiksel yönden ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0,01$ ) (Tablo 1).

Demir eksikliği olan çalışma grubunda hipersegmentasyon varlığı demir eksikliği grubunda %30,4 (31/71), kontrol grubunda %9,5 (2/19) oranında tesbit edilerek iki grup arasında anlamlı derecede fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

Çalışma grubunda lop sayılarına göre ferritin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ( $p>0,05$ ). 4'lü lop grubunun ferritin düzeyi en yüksektir. Altılı lopta ise ferritin çok düşmüştür. Ferritin dağılımları normal olmadığından parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis varyans analizi uygulanmış ve bunun sonucunda anlamlı fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Kontrol grubunda ise olguların çok büyük bir kısmı 4 lopludur. Beş loba sahip sadece iki olgu olduğu için istatistiksel bir karşılaştırma yapılamamıştır (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Demir eksikliği anemisi halen en sık görülen nutrisyonel anemi tipi olup özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (3).

Çalışma grubumuzda, demir eksikliğinin erkeklerde kızlara göre daha fazla olduğunu bulduk. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda böyle bir fark görülmemiştir. Bunun vaka sayısının az olmasından kaynaklanan bir tesadüf olduğunu düşünmekteyiz.

Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda araştırmacılar, demir eksikliği için tek bir parametrenin yeterli belirleyici olmadığı konusunda hem fikirdir (4). Özellikle serum ferritin düzeyinin  $<35 \mu\text{g/l}$  olması demir eksikliği anemisi için standart olarak kabul edilmiştir (5,6). Ancak Mark ve arkadaşlarının (7) yaptığı çalışmada ferritin tek başına ölçümünün demir transportu ve demir depoları konusunda yeterli bilgi sağlamadığı, demir eksikliği anemisinin şiddetini belirlemede güvenle kullanılamayacağı, bu nedenle serum demiri ve transferrin saturasyonunun da birlikte bakılması gerektiği gösterilmiştir. Hastka ve arkadaşlarının (4) yaptığı serum ferritin düzeyi ve demir eksikliği anemisinin şiddeti konusundaki çalışma da aynı doğrultudadır.

Bizim çalışmamızda da demir eksikliği anemisi göstergesi olarak ferritin düzeyini, serum demirini, serum demir bağlama kapasitesini, transferrin saturasyonunu kriter olarak aldık.

Çalışmamızda MCV ve MCH'yi kontrol grubuna göre ileri derecede düşük bulduk. Daha önceki çalışmalarda da demir eksikliğinin geç bulgusu olarak MCV ve MCH'nin azaldığı gösterilmiştir (6-8).

Çalışma grubumuzun trombosit düzeyi de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Trombopoezin regülasyonunun pek çok değişik sitokin ile kontrol edildiği çalışmalarla gösterilmiştir. İnterlökin 3, granülosit-monosit koloni stimulan faktör, eritropoetin gibi bazı sitokinlerin in vitro olarak megakaryopoezisi stimüle ettiği bilinse de bunların in vivo etkinliği gösterilememiştir (9,10). Trombopoetinin yakın zaman-



da keşfi ile, trombosit üretimini kontrol eden mekanizmalar anlaşılmaya başlanmıştır (9). Eritropoetin molekül yapısı trombopoetine benzer. Eritropoetin, demir eksikliği anemisinde reaktif trombositozu açıklayabilecek sitokinlerden biridir. Akan ve arkadaşlarının (11) yaptığı çalışmada demir eksikliği olan hastalarda demir replasman tedavisinin trombosit sayılarını normale döndürdüğü, eritropoetin düzeylerini düşürdüğü gösterilmiş, ancak trombosit sayıları ile eritropoetin düzeyleri arasında korelasyon bulunamamıştır.

Demir eksikliğinde, nötrofil hipersegmentasyonunun varlığını ortaya koyan ilk çalışmalar 1965-1978 yıllarında başlamıştır (12-14). Demir eksikliği ve nötrofil hipersegmentasyonu arasındaki bağlantı olduğu ilk olarak Chanarin (12) tarafından ortaya atılmıştır. Doğum öncesi hamilelerde yapılan bu çalışmada multi loplü polimorfların demir eksikliğinde en yüksek insidanda olduğu bildirilmiştir.

Beard ve Weintraub'un (13) yaptıkları çalışmada demir eksikliği olan 3 hastada nötrofil hipersegmentasyonu olduğu belirtilmiştir. Bu hastaların hiç birinde hipersegmentasyon için etyolojik sebep sayılabilecek folat ve kobalamin (B<sub>12</sub>) eksikliğinin olmadığı gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da demir eksikliği tespit edilen grupta (%30,4), kontrol grubuna göre (%9,5), nötrofil hipersegmentasyonu anlamlı olarak yüksek bulunmuş, demir eksikliği ve nötrofil hipersegmentasyonu saptanan çocukların hepsinde folik asit ve B<sub>12</sub> düzeyleri normal bulunmuştur.

Demir eksikliği anemisinde nötrofil hipersegmentasyonunun mekanizması bilinmemektedir. Demir eksikliğinde folat metabolizması normal olmayabilir. Davidson (15), demir eksikliğinin karakteristik bulgusu olarak dev metamyelositlerin gelişmesini ve nötrofillerin sağa doğru kaymasını bildirmiş ve Beard ve Weintraub (16) da bunun folat eksikliğine bağlı olmadığını göstermişlerdir. Demir eksikliğinin formiminotransferaz aktivitesini azaltabileceğini belirtmişlerdir. Demir eksikliği anemisinde folatın kullanılmamasına, figlu transferazın kata-

lizlediği folata bağlı figlu (formiminoglutamat) yıkımı üzerinde demir eksikliğinin sebep olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (13,16-18).

Demir eksikliği anemili hastalardaki nötrofil değişiklikleri özellikle genç eritrositlerle ilişkilidir. Tüm eritrosit popülasyonunda ise folat konsantrasyonu düşük görülebilir. Serum folat düzeyindeki herhangi bir düşüş eritrosit içi folat düzeyinde de düşüklüğe sebep olabilir. Ancak Westerman ve arkadaşları (14) yaptıkları çalışmada hasta grubunda böyle bir düşüklük saptamamışlardır. Demir eksikliği anemisi olan gruptaki eritrosit içi folat düzeyleri daha önce Hansen'nin (19) de bildirdiği gibi belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Demir eksikliği olan hücreler tarafından devam eden ancak etkisiz folat kullanımı faktörlerden biri olabilir.

Roberts ve arkadaşlarının (20) yaptıkları çalışmada, tedavi edilmemiş basit hipokromik anemili hastalarda yüksek oranda morfolojik nötrofil seri değişiklikleri olduğu bulunmuştur. Hastaların çoğunda kemik iliğinde yüksek ortalama lop sayısı, hipersegmente nötrofiller ve dev metamyelositler görülmüştür. Anormal figlu ve düşük serum folat düzeyleri saptanmıştır. Tam tersine ortalama eritrosit içi folat düzeyleri normalden daha yüksek bulunmuştur.

Hoffbrand ve arkadaşları (21) yüksek eritrosit içi folat düzeylerini dolaşımda artan genç eritrositlere bağlamışlardır.

Hansen'nin (19) yaptığı çalışmada da demir eksikliği anemisinde tam kan folat düzeylerinin normal kontrol grubundan yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç Roberts'ın (20) sonuçlarıyla örtüşmektedir. Yüksek eritrosit içi folat düzeyleri dolaşımda artan genç kırmızı hücrelere bağlanması görüşü (21), Roberts'ın (20) sonuçlarıyla birebir uyumlu bulunamamıştır. Roberts, kendi serilerinde, yüksek kırmızı hücre folat düzeyi ile retikülosit sayısı arasında ilişki bulunamamıştır. Roberts, doku folat düzeyi olarak kırmızı hücre folat seviyesinin, belirgin folat eksikliğinin en iyi göstergesi olduğunu ve bunda birlikte olabilen demir eksikliğinden çok az etkilendiğini belirtmiştir. Çalışmamızda tek-

nik yetersizlik nedeniyle eritrosit içi folat düzeyini ölçemedik.

Nötrofil DNA sentezinin neresinde demirin etki ettiği bilinmiyor. Demir folat metabolizması ve/veya granülosit DNA'sı için önemli kofaktör olabilir (14).

Demir eksikliği anemisinde demir tedavisinin folat durumu üzerine ya da folat durumunun demir tedavisi üzerine etkileri çok az araştırılmıştır (20). Valez ve arkadaşları tarafından (22) yapılan bir çalışmada demir eksikliği olan 6 hastaya tek başına oral demir verilerek serum folat konsantrasyonunda belirgin yükselme olduğu belirtilmiştir. Tüm bunlara ek olarak hastaların demir tedavisi ile geri dönen megaloblastik değişiklikleri de rapor edilmiş, bu sonuç araştırmacılar arasında demir eksikliğinizi sekonder folat eksikliğine neden olabileceği tartışmasını başlatmıştır. Bu görüş daha önce Chanarin ve arkadaşlarının (12) hamile kadınlar üzerinde yaptığı çalışmada da öne sürülmüştür; gebelik sırasında profilaktik demir alan kadınların folat düzeyinde anlamlı artış saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, en düşük ferritin düzeyinin altı loplü nötrofillere sahip grupta bulunmuş olmasına karşılık, ferritin düzeyi ile hipersegmente nötrofillerdeki lop sayısı arasında ilişki bulunamamıştır.

Kemik iliğinde dev metamyelositlerin ve periferik kan nötrofillerinin multi loplularının demir tedavisinden sonra daha az belirgin hale gelmesi, bazı durumlarda demir eksikliğini -en azından kısmen- buna sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bu hücrelerin, demir yüklenmiş klasik megaloblastik anemili hastalarda da görülmesi demir eksikliği ile olan ilişkinin çok basit olmadığı sonucunu doğurmuştur (20).

Hansen ve arkadaşları (19) kemik iliğindeki dev metamyelositlerin üç günlük demir tedavisinden sonra değişiklik göstermediğini, ancak üç haftalık tedaviden sonra kaybolduğunu göstermişlerdir.

Metz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (23) postpartum anemide, nötrofil multi lobularitesi ve dev metamyelositler altı haftalık İV demir infüzyonundan sonra daha az görülmüştür.

Omer ve arkadaşlarının (24) yaptığı çalışmada ağızdan demir tedavisinden sonra plazma folat seviyesinde %5 kadar istatistikî anlamlı bir yükseliş olduğu görülmüş, ancak tedavi öncesi ve sonrasında tüm değerler normal sınırlarda olmasına rağmen, kontrol grubunda folat düzeyleri benzer aralıklarla ölçülmediği için net bir şey söylenemez denmiştir.

Demir eksikliği durumunda folat eksikliğini gösteren veriler çok anlamlı değildir. Hatta altı haftalık demir replasmanından sonra bile ilişki halen çok belirgin değildir. Ancak bu altı hafta zarfında hastalar halen demir tedavisine cevap verdiklerinden, belirgin folat eksikliği durumu ile ilgili korelasyon tam ortaya çıkmayıp, hastaların hematolojik olarak stabil olmasından sonra belirginleşebilir (20).

Das ve arkadaşları (25) demir eksikliği ve nötrofil hipersegmentasyonu olan ancak folat ya da kobalamin eksikliğine dair biyokimyasal parametresi olmayan on hasta bildirmişlerdir. Hastaların altı tanesine tek başına demir tedavisi yapılmış ve bunların beşinde nötrofil hipersegmentasyonu devam etmiştir.

Bizim çalışmamızda da hastalara oral demir tedavisi başlanmıştır. Hastalar izlenmeye devam edilmektedir.

Sonuç olarak; nötrofil hipersegmentasyonu genellikle megaloblastik anemilerde beklenen bir periferik yayma bulgusu olmakla beraber az da olsa demir eksikliği anemisinde de görülebilir. Bunun için demir eksikliği anemisi ile birlikte nötrofil hipersegmentasyonu saptanan vakalarda B<sub>12</sub> ve folik asit düzeyleri mutlaka bakılmalı, ancak bunlar normal olduğunda nötrofil hipersegmentasyonunun, demir eksikliği anemisine bağlı olabileceği kabul edilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Lönnerdal B, Dewey KG. Epidemiology of Iron Deficiency in Infants and Children. *Annales of Nestle* 1995; 53 (1) : 11-17.
2. Reid CD, Prouse PJ, Babbista LC, Gumpel JM, Chanarin I. The Mechanism of Anemia in Rheumatoid Arthritis. *Br J Haematology* 1984; 58 (4) : 607-615.
3. Soysal T, Soygan LY. Anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:25 2001; 25-40.
4. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al. Laboratory tests of iron status: Correlation or common sense? *Clin Chem.* 1996; 718-724.
5. Morgan DL, Peck SD. The Use of red cell distribution width in the detection of iron deficiency in chronic hemodialysis patients. *Am J Clin Pathol.* 1988; 89: 513-515.
6. Jaime JC, Cazarez r, Mares MA, et al. Iron stores in remunerated blood donors as evaluated by plasma ferritin levels. *Transfusion.* 1988; 62-65.
7. Rodgers, M.S., Chang, C.C. & Kass, L. Elliptocytes and tailed poikilocytes correlate with severity of iron deficiency anemia. *American Journal of Clinical Pathology.* 1999; 111: 672-675.
8. Fairbanks VF, Beutler E. Iron deficiency. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, et al, eds. *Hematology.* New York, NY: McGraw Hill; 1990: 482-505.
9. Hangoc G, Yin T, Cooper S, Schendal P, Yang Y-C, Broxmeyer HE: In vivo effects of recombinant IL-11 on myelopoiesis in mice. *Blood* 1993; 81: 965-972.
10. Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA: Human IL-6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5953-5957.
11. Akan H, Güven N, Aydoğdu I, Arat M, Bektaş M: Thrombopoietic cytokines in patients with iron deficiency anemia with or without thrombocytosis. *Acta Haematologica* 2000; 103: 152-156.
12. Chanarin, J., Rothman, D. & Berry, V. Iron deficiency and its relation to folic acid status in pregnancy: results of clinical trial. *British Medical Journal* 1965; 1: 480-485.
13. Beard, M.E.J. & Weintraub, L.R. Hypersegmented neutrophilic granulocytes in iron deficiency anemia. *British Medical Journal* 1969; 16: 161-163.
14. Westerman DA, Evans D, Metz J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anemia: a case control study. *Br J Haematol.* 1999; 107: 512-513.
15. Davidson, W. M.: Iron metabolism and the treatment of iron deficiency anemia. In F. G. J. Hayhoe (Ed.) : *Lectures on Haematology*, Cambridge, Cambridge University Press, 1960, p. 18.
16. Chanarin, I., Bennet, M.C. & Berry, V. Urinary excretion of histidine derivative in megaloblastic anemia and other conditions in a comparison with the folic acid vitale, J.J., Restrepo, A., Velez, H., Riker, J.B. & Hellerstein, E.E. Secondary folate clearance tests. *Journal of Clinical Pathology* 1962; 15: 269-273.
17. Vitale J.J., Restrepo A., Velez, H., Riker, J.B. Secondary folate deficiency induced in rat by dietary iron deficiency. *Journal of Nutrition* 1966; 88: 315-322.
18. Arakawa, T. Congenital defects in folate utilization. *American Journal of Medicine* 1970; 48: 594-598.
19. Hansen, H.A. On the diagnosis of folic acid deficiency. *Almqvist & Wiksell* 1964. Stockholm.
20. Roberts, P.D., St John, D.J.B., Sinha, R., Stewart, J.S., Baird, I.M., Coghill, N.F. & Morgan, J.O. Apparent folate deficiency in iron deficiency anemia. *1971 British Journal of Haematology*; 20: 165-175.
21. Hoffbrand, A.V., Newcombe, B.F.A. & Mollin, D.L. Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency. *Journal of Clinical Pathology* 1966; 19: 17.
22. Valez, H., Restrepo, A., Vitale, J.J., and Hellerstein, E.E. Folic acid deficiency secondary to iron deficiency in man. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1966; 19: 27.
23. Metz, J., Edelstein, T., Divaris, M. & Zail, S.S. Effect of total dose infusion of iron dextran on iron, folate and vitamin B12 nutrition in postpartum anemia. *British Medical Journal* 1967; iii: 403.
24. Omer, A., Finlayson, N.D.C., Shearman, D.J.C., Samson, R.R. & Girdwood, R.H. Plasma and erythrocyte folate in iron deficiency and folate deficiency. *Blood* 1970; 35: 821-828.
25. Das, K.C., Herbert, V., Colman, N. & Longo, D.L. Unmasking covert folate deficiency in iron deficiency subjects with neutrophil hypersegmentation: dU suppression tests on lymphocytes and bone marrow. *British Journal of Haematology* 1978; 39: 357-374.