

การศึกษาหาระดับ serum ceruloplasmin ในคนไทยปกติและผู้ป่วย

สุดา ธีรรัตนานนท์*
อมพร สคนธมาน*
น้อย ตันตยาภิวัฒน์*

The average serum ceruloplasmin (copper binding protein) level in 100 healthy Thai adults, age 20-60 years, employing the Ravin's colorimetric enzymatic assay method, was obtained at 35.19 ± 6.38 (mean \pm S.D) mg per 100 milliliters. This value showed no significant variation according to the age and sex. Serum ceruloplasmin level decreased in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) and the nephrotic syndrome, but increased in those affected with chronic infection (pneumonia, pulmonary tuberculosis), chronic immune complex diseases (systemic lupus erythrematosus, rheumatic fever, rheumatoid arthritis and acute glomerulonephritis). The estimation of the serum ceruloplasmin level is useful as a screening test for abnormal copper metabolism in Thai people.

Ceruloplasmin เป็นโปรตีนชนิด α_2 -globulin มีน้ำหนักโมเลกุล 151,000 และมีสีน้ำเงิน ใน 1 โมเลกุลของโปรตีนมี copper (Cu) เป็นส่วนประกอบอยู่ 8 อะตอม ซึ่งเท่ากับ 0.32% โดยน้ำหนัก⁽¹²⁾ จึงเรียกว่าเป็น metalloprotein นอกจากนี้ ceruloplasmin ยังมีคุณสมบัติเป็นพวก glycoprotein โดยมี carbohydrate เป็นส่วนประกอบอยู่ 7.5%⁽¹⁹⁾ ceruloplasmin สร้างขึ้นที่ตับและส่งเข้าสู่กระแสเลือด^(8,10) สกัดแยกได้จากซีรัมคน⁽¹²⁾, ในคนปกติ copper ประมาณ 96% ของจำนวน serum copper จะรวมตัวอย่างแน่นอยู่กับ ceruloplasmin⁽¹⁰⁾ Copper ที่อยู่ใน complex นี้เรียกว่า indirect-reacting copper fraction

* แผนกเวชศาสตร์ชั้นสูตกร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(เพราะว่า Cu-ceruloplasmin ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ copper chelator คือ Sodium diethyldithiocarbamate) copper อีกประมาณ 0.7 % ของซีรัม copper ซึ่งรวมอยู่อย่างไม่แน่นกับซีรัม albumin⁽³⁾ มีปฏิกิริยากับ carbamate ได้โดยตรง เรียกส่วนนี้ว่า direct reacting copper fraction⁽⁶⁾ ส่วนนี้มีหน้าที่ช่วยในการนำ copper ที่ได้จากอาหาร จากลำไส้เล็ก ไปยังตับและ tissues อื่น (bone marrow, kidney, heart, spleen และ brain) หรือระหว่าง tissues ต่างชนิด^(4,10) สำหรับหน้าที่ของ ceruloplasmin ยังไม่ทราบแน่นอน ในปัจจุบันเข้าใจว่าจะเกี่ยวกับการควบคุมการสะสมของ copper ภายในเซลล์โดยที่ ceruloplasmin ทำหน้าที่เป็น excretory carrier ของ Cu ในกระแสโลหิตเพื่อป้องกันการสะสมที่มากเกินไปใน tissue^(8,18) ในคนปกติไม่พบ ceruloplasmin ในปัสสาวะ⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ ceruloplasmin ยังทำหน้าที่เป็น copper oxidase enzyme ในหลอดทดลอง คือสามารถ oxidize สารที่เป็น substrate หลายอย่างเช่น paraphenylene diamine (PPD), benzidine, ascorbic acid, serotonin และ catechols⁽¹⁸⁾ จึงเรียกโปรตีนชนิดนี้ว่า metalloenzyme แต่ไม่มีหลักฐานแสดงว่าปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นในร่างกายหรือมีความสำคัญต่อ metabolic processes^(18,19)

ในภาวะที่ร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและในพยาธิสภาพหลายอย่าง ปริมาณของ total serum copper และ indirect reacting copper fraction มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับของซีรัม ceruloplasmin^(1,16) ได้มีผู้ศึกษาระดับซีรัม ceruloplasmin พบว่าในเด็กแรกเกิดจนถึงอายุ 3 เดือนมีค่าต่ำ ในหญิงมีครรภ์ระยะ 3 เดือนหลังมีระดับสูง⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ได้มีรายงานระดับซีรัม ceruloplasmin ต่ำในโรค Wilson's disease, nephrotic syndrome, sprue syndrome, severe anemia และ malnutrition ส่วนระดับซีรัม ceruloplasmin สูงนั้นพบในภาวะของ acute และ chronic infections, cirrhosis of liver, thyrotoxicosis, cancers, leukemia, ระยะรื้อฟื้นของ myocardial infraction, rheumatoid arthritis และ Lupus erythematosus^(1,5,9,11,16,18)

การวัดค่าซีรัม ceruloplasmin นั้นทำได้โดยใช้ immunochemical assay หรือวัด capacity ในการ oxidation สาร substrates ด้วยการใช้ spectrophotometer หรือ gasometer แต่วิธีของ Ravin⁽²⁰⁾ ซึ่งใช้ spectrophotometer ในการวัด oxidase activity ของ ceruloplasmin ที่มีต่อ paraphenylene diamine นั้นทำได้ง่ายมีความไว (sensitivity) และความชัดเจน (specificity) สูง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำวิธีที่ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Ravin มาใช้วัดค่าซีรัม ceruloplasmin ในผู้ใหญ่คนไทยที่มีสุขภาพปกติ และในผู้ป่วยด้วยโรคที่เคยมีรายงานไว้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับของซีรัม ceruloplasmin ทั้งนี้เพื่อที่จะได้ทราบว่ามีวิธีการวัดระดับซีรัม ceruloplasmin ที่ได้ทำขึ้นในแผนกเวชศาสตร์ชั้นสูตานั้น มีความเหมาะสมหรือมีประโยชน์อย่างไรในการช่วยการวินิจฉัยโรค

วัสดุและวิธีการ

ก. กลุ่มคนที่มีสุขภาพปกติ 100 คน เป็นชาย 75 คน และหญิง 25 คน อายุระหว่าง 20-60 ปี

ข. กลุ่มผู้ป่วย 125 คน ซึ่งป่วยเป็น

1. nephrotic syndrome 22 คน
2. chronic infection 8 คน (pneumonia 6 รายและ pulmonary tuberculosis 2 ราย)
3. chronic immune-complex disease 94 คน ประกอบด้วยโรค

— systemic lupus erythematosus (SLE) 21 ราย

— SLE with nephritis 7 ราย

— rheumatic fever 21 ราย

— rheumatic arthritis 7 ราย

— acute glomerulonephritis 38 ราย

4. Wilson's disease (Hepatolenticular degeneration) 1 ราย

ค. หลักการของการวัดค่าซีรัม ceruloplasmin ด้วยวิธีของ Ravin^(18,20) เป็นการวัด oxidase activity ของโปรตีนที่มีต่อสาร PPD-dihydrochloride ซึ่งจากปฏิกิริยาเกิดเป็นสารสีม่วง ซึ่งวัด optical density ด้วย spectrophotometer ได้ที่ wave length 530 nm การใช้วิธีนี้ในห้องปฏิบัติการพบว่าเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายรวดเร็ว มีความแม่นยำ (precision) ดีและมี coefficient of variation (C.V.)=6.93 %

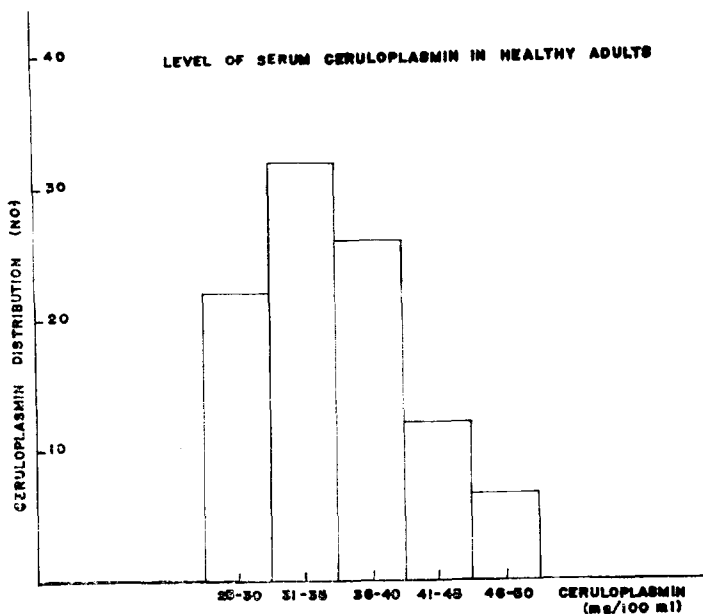
การทดสอบ ใช้ซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือดของคนกลุ่มต่าง ๆ ในตอนเช้าโดยที่ไม่ต้องงดอาหาร ปริมาณเลือดที่เจาะคนละ 5 มล. และแยกซีรัมเก็บไว้ที่ -20°C จนกระทั่งทำการทดลอง ค่าซีรัม ceruloplasmin ที่ได้มีหน่วยเป็น mg/100 ml

การเปรียบเทียบผลทางสถิติใช้ Student's-t test

ผล

ก. ในกลุ่มคนที่มีสุขภาพปกติ

ซีรัม ceruloplasmin ที่พบในคนสุขภาพปกติ 100 ราย มี range ระหว่าง 25.37-49.87 mg/100 ml และค่า mean±S.D.=35.19±6.38 mg/100 ml ค่าที่ได้มีการกระจายของความถี่ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งการกระจายของค่าเป็นแบบที่ค่อนข้างเอียงไปทางขวา



ภาพที่ 1 แสดงการกระจายความถี่ของ serum ceruloplasmin ในคนสุขภาพดีจำนวน 100 ราย

ความสัมพันธ์ของซีรัม ceruloplasmin กับเพศ ค่าของซีรัม ceruloplasmin ในผู้ชาย 75 ราย range ระหว่าง 25.37-49.87 mg/100 ml ค่า mean \pm S.D. = 35.28 \pm 6.41 mg/100 ml ค่าของซีรัม ceruloplasmin ในผู้หญิง 25 ราย range ระหว่าง 25.37-47.25 mg/100 ml ค่า mean \pm S.D. = 34.92 \pm 6.42

mg/100 ml การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของ ceruloplasmin ในชายและหญิงพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ความสัมพันธ์ของซีรัม ceruloplasmin กับอายุ ระดับซีรัม ceruloplasmin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของซีรัม ceruloplasmin กับอายุ

กลุ่ม	อายุ (ปี)	จำนวน (ราย)	ซีรัม ceruloplasmin (mg/100 ml)	
			range	mean \pm S.D.
1	20 - 30	41	25.37 - 49.87	35.20 \pm 6.06
2	31 - 40	39	25.37 - 48.12	35.22 \pm 6.36
3	41 - 50	16	25.37 - 49.87	36.53 \pm 7.37
4	51 - 60	4	32.37 - 47.25	38.28 \pm 7.27

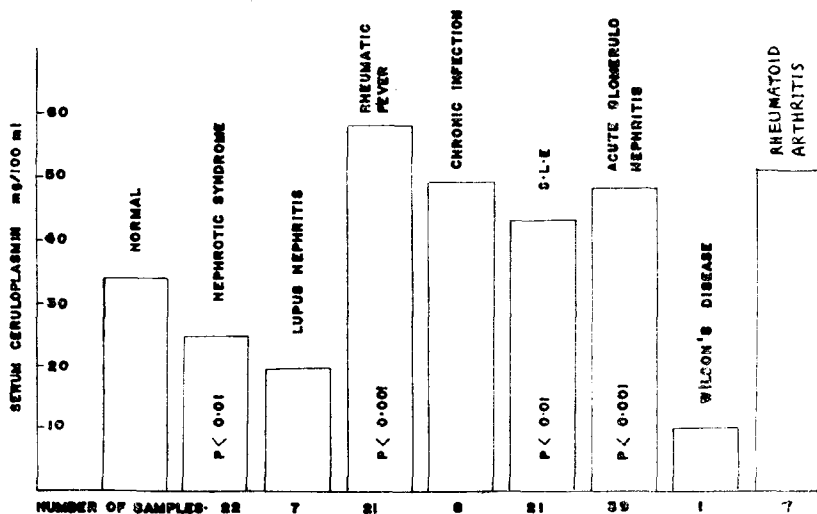
ค่าเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคนในกลุ่ม 1 กับกลุ่ม 2 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
 ค่าเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคนในกลุ่ม 1 กับกลุ่ม 3 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
 ค่าเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคนในกลุ่ม 2 กับกลุ่ม 3 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
 สำหรับคนในกลุ่มที่ 4 นั้นมีจำนวนเพียง 4 ราย จึงไม่ได้เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

ข. ในกลุ่มผู้ป่วย ผลการศึกษาได้ในภาพที่ 2

๑. ในผู้ป่วยที่เป็น nephrotic syndrom มีระดับ ceruloplasmin ในซีรัมอยู่ระหว่าง 14.00 - 57.75 mg /100 ml ค่า mean \pm S.D. = 25.59 \pm 20.36 mg/ml 100 ml ซึ่งต่ำกว่าค่าที่พบในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ในจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้ 22 ราย มีค่าซีรัม ceruloplasmin ต่ำกว่าระดับเฉลี่ยของคนสุขภาพปกติ 14 ราย ซึ่งเท่ากับร้อยละ 63.7%

2. ค่าซีรัม ceruloplasmin ของผู้ป่วยด้วยโรค chronic infections มี range ระหว่าง 44.75-56.00 mg/100 ml ค่า mean \pm S.D. = 49.76 \pm 4.82 mg /100 ml ซึ่งเห็นได้ว่าสูงกว่าระดับปกติ ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จำนวนเพียง 8 ราย จึงไม่ได้เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ แต่ผู้ป่วยจำนวน 5 ราย มีค่าซีรัม ceruloplasmin สูงซึ่งเท่ากับร้อยละ 62.5%

LEVELS OF SERUM CERULOPLASMIN IN VARIOUS DISEASES



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยของระดับ serum ceruloplasmin ของคนปกติและผู้ป่วย

3. ในกลุ่มผู้ป่วยด้วยโรค chronic immune complex นั้น เช่นในโรค SLE, rheumatic fever, rheumatoid arthritis และ acute glomerulonephritis มีค่าซีรัม ceruloplasmin สูงส่วนในโรค SLE with nephritis

(lupus nephritis) มีค่าซีรัม ceruloplasmin ต่ำกว่าปกติดังแสดงในตารางที่ 2

4. ผู้ป่วยที่เป็น Wilson's disease 1 ราย มีระดับ ceruloplasmin ในเลือดต่ำ คือ 10.5 mg /100 ml

ตารางที่ 2 ระดับ serum ceruloplasmin ในผู้ป่วยโรค chronic - complex immune disease

สภาวะ	จำนวน (คน)	ceruloplasmin (mg 100 ml)		p value*	ร้อยละของค่าที่เปลี่ยนแปลง
		range	mean ± S.D.		
healthy subject	30	25.37 - 49.87	34.55 ± 7.78	-	
SLE	22	30.62 - 77.00	43.62 ± 10.87	< 0.01	50.0 (11)**
rheumatic fever	21	37.62 - 122.48	58.49 ± 20.67	< 0.001	76.2 (16)**
rheumatoid arthritis	7	38.50 - 61.24	51.49 ± 8.56	-	71.4 (5)**
acute glomerulonephritis	38	18.37 - 73.50	48.19 ± 15.23	< 0.001	55.3 (21)**
SLE with nephritis	7	13.12 - 28.00	20.62 ± 5.81	-	71.4 (5)**

* P value เมื่อเปรียบเทียบค่า mean ± SD ceruloplasmin ของโรคต่าง ๆ กับค่าที่พบในคนปกติจำนวน 30 คน

** ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของ ceruloplasmin

วิจารณ์

ผลของการศึกษาพบว่าวิธีหาค่าซีรัม ceruloplasmin ด้วยวิธีใช้ปรัปรุงจาก colorimetric enzymatic assay ของ Ravin⁽²⁰⁾ นั้น เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะวิธีทำงานง่าย เสียเวลาน้อย ค่าใช้จ่ายไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

นอกจากนี้วิธีนี้ยังให้ผลการทดลองที่มีความไวและความแม่นยำดีเหมือนที่ Ravin ได้

รายงานไว้⁽²⁰⁾ และเมื่อใช้วิธีนี้ทดสอบ ค่าซีรัม ceruloplasmin ในโรคต่างๆ ก็สามารถแสดงความเปลี่ยนแปลงของระดับได้ในรายงานนี้พบว่าผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพปกติ 100 คนมีค่าเฉลี่ยซีรัม ceruloplasmin ± S.D.=35.19 ± 6.38 mg /100 ml ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Ravin ได้รายงานไว้คือ 32.3 ± 4.9 mg/100 ml ส่วนการกระจายตัวของค่าที่ได้เป็นแบบมีความเบ้ (skewness) ไปทางบวก (ภาพที่ 1) ต่างกับ

ที่ Ravin ได้ศึกษาไว้ว่าเป็นแบบ normal distribution แต่ Cartwright และ Wintrobe⁽⁶⁾ ได้รายงานค่าซีรัม ceruloplasmin ในคนปกติ ซึ่งวัดด้วยวิธี immunochemical method ว่าค่า mean = 33 mg /100 ml (จำนวน 30 คน) และได้การกระจายตัวเป็นแบบเดียวกับที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ผลการศึกษาในรายงานนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่าที่พบในหญิงและในชายคงเนื่องจากว่าจำนวนเป็นหญิงน้อยกว่าจำนวนของชาย แต่จากรายงานการศึกษาอื่นพบว่าหญิงมีค่า ceruloplasmin ในกระแสโลหิตสูงกว่าชาย^(6,18) ทั้งนี้เพราะว่า estrogens ทำให้ระดับ ceruloplasmin สูงขึ้น⁽²²⁾ โดยเฉพาะในระยะครึ่งหลังของการตั้งครรภ์ซึ่งมีระดับ estrogens สูงจะมีการเพิ่มระดับของ ceruloplasmin^(6,16) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าระดับซีรัม ceruloplasmin ในผู้ใหญ่ไทยไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (ระหว่าง 20 - 60 ปี) เกือบกับผลของอายุนี้ ได้มีรายงานว่าระดับของ ceruloplasmin ในเด็กอายุหนึ่งขวบไม่แตกต่างกับระดับที่พบในผู้ใหญ่⁽¹⁷⁾ แต่ยังไม่มียารายงานเปรียบเทียบค่าในผู้ใหญ่ที่ระดับอายุต่าง ๆ กัน

ผลการ ศึกษา ครั้งนี้เกี่ยวกับ ระดับ ซีรัม ceruloplasmin ในกลุ่มผู้ป่วยนั้นพบว่า มีซีรัม

ceruloplasmin ต่ำ ในโรค Wilson's disease ซึ่งโรคนี้เป็น autosomal recessive abnormality ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน มีการเปลี่ยนแปลงของ copper metabolism โดยมี copper ไปจับตัวอยู่ที่เซลล์ของ liver และ brain และมีการเปลี่ยนแปลงระดับของ copper ใน body fluid คือ total serum copper ต่ำกว่าระดับปกติ urinary excretion ของ copper สูง และ indirect - reacting copper fraction (Cu - albumin) ในซีรัมลดลงมาก ส่วน direct - reacting copper fraction (Cu - albumin) ในซีรัมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่พบ ceruloplasmin ในปัสสาวะ^(2,7,18,21) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผล เนื่องจากมีการลดปริมาณการสร้าง ceruloplasmin จากตับ⁽¹⁸⁾

จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยของ ซีรัม ceruloplasmin ต่ำในผู้ป่วยที่เป็น nephrotic syndrome ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับรายงานอื่น^(5,16) ซึ่งวัดด้วย immunochemical assay ทั้งนี้เพราะมีการจับ Cu - ceruloplasmin ออกจากปัสสาวะเป็นจำนวนมาก^(5,16)

การที่ในกลุ่มโรคทั้งสองคือ chronic infections และ chronic - immune complex diseases (ตารางที่ 2) มีระดับเฉลี่ยของซีรัม

ceruloplasmin เพิ่มขึ้น เข้าใจว่าคงเนื่องมาจากกลวิธีที่คล้ายคลึงกัน ในพวก chronic infections นั้น Markowitz และคณะ⁽¹⁶⁾ พบว่ามี total serum copper, direct - reacting copper, ceruloplasmin indirect - reacting copper สูง Lahey และคณะ⁽¹⁵⁾ พบว่าระดับ total serum copper เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็น rheumatic fever และ rheumatoid arthritis โดยที่อัตราการขับ copper ออกจากร่างกายเท่ากับของคนปกติ ดังนั้นในกลุ่มโรคทั้งสองที่มีการเพิ่มระดับของ copper ในซีรัม โดยเฉพาะ copper ที่รวมตัวอยู่กับ ceruloplasmin เนื่องจาก ceruloplasmin เป็นโปรตีนซึ่งจะถูกสร้างจากตับมากขึ้นในกรณีที่ร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อภาวะของ infection หรือ severe illness ซึ่งเรียกสภาวะนี้ว่า acute phase reaction⁽¹⁸⁾ ดังนั้นใน acute หรือ chronic infection จึงมี ceruloplasmin ในกระแสโลหิตเพิ่มขึ้น สาเหตุที่ serum ceruloplasmin เพิ่มในกลุ่มโรคพวก chronic - immune complex ก็น่าจะ

เกิดจากวิธีเดียวกันกับพวก chronic infectious disease คือมีการเพิ่มการสร้างของ ceruloplasmin จากตับ สำหรับโรค SLE ที่ร่วมกับ nephritis มีระดับเฉลี่ยของซีรัม ceruloplasmin ต่ำในรายงานนั้นนี้อาจจะเนื่องจากการขับ Cu - ceruloplasmin ออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นในกรณีของ nephrosis อย่างไรก็ตามการศึกษาในรายงานนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น

ดังนั้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระดับ copper ใน body fluids เช่น total serum copper, indirect - reacting copper, direct - reacting copper ในเลือดและ urinary excretion ของ copper พร้อมกับการหาค่าของ ceruloplasmin ในซีรัมจะช่วยแสดงถึงสาเหตุที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง copper metabolism ในภาวะที่ร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ และในผู้ป่วยได้ดียิ่งขึ้น การวัดค่า serum ceruloplasmin อย่างเดียวใช้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นที่อาจช่วยเป็นเครื่องแสดงว่ามีความผิดปกติของ copper metabolism เกิดขึ้นในร่างกาย

Reference

1. Adelstein, SJ, Coombs, TL, Vallee, BL : Metalloenzymes and myocardial infarction II. The relation between serum copper and ceruloplasmin and its catalytic activity. *New Eng. J. Med.* 255 : 105-9, 56.
2. Bearn, AG, Kunkel, HG : Biochemical abnormalities in Wilson's disease. *J. Clin Invest* 31 : 616, 52.
3. Bearn, AG, Kunkel, HG : Localization of Cu⁶⁴ in serum fractions following oral administration : An alteration in Wilson's disease. *Proc Soc Expt Biol Med* 85 : 44-48, 54.
4. Bush, JA, Mahoney, JP, Markowitz, H, et al : Studies on copper metabolism. XVI Radioactive copper Studies in normal Subjects and in patients with hepatolenticular degeneration. *J Clin Invest* 34 : 1766-78, 55.
5. Cartwright, GE, Gubler, CJ, Wintrobe, MM : Studies on copper metabolism. XI. copper and iron metabolism in the nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* 33 : 685-98, 54.
6. Cartwright, GE, Wintrobe, MM : Copper metabolism in normal Subjects. *Am J Clin Nutr* 14 : 224-32, 64.
7. Denny-Brown, D, Porte, H : The effect of BAL (2,3 dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) *New Eng J Med* 245 : 917-25, 51.
8. Dowdy, RP : Copper metabolism. *Am J Clin Nutr* 22 : 887-92, 69.
9. Gubler, CJ, Brown, H, Markowitz, GE, et al : Studies on copper metabolism. XXIII. Portal (Laennec's) cirrhosis of the liver. *J Clin Invest* 36 : 1208-16, 57.
10. Gubler, CJ, Lahey, ME, Cartwright, GE, et al : Studies on copper metabolism. IX The transportation of copper in blood. *J Clin Invest* 32 : 405-14, 53.
11. Harper, H.A : Review of Physiological chemistry, 13th ed, Asian ed. Medical Publications, Maruzen Company, Ltd, 1971. chap 19, pp 408-409 "Water and Mineral Metabolism"
12. Holmberg, CG, Laurell, C-B : Investigations in Serum copper. II. isolation of the copper containing protein, and a description of some of its properties. *Acta Chem Scand.* 2 : 550, 56, 48.
13. Holmberg, CG, Laurell, C-B : Investigations in serum copper III. ceruloplasmin as an enzyme. *Acta Chem Scand.* 5 : 476-80, 51.
14. Lahey, ME, Gubler, CJ, Cartwright, GE, et al : Studies on copper metabolism. VI Blood copper in normal human subjects. *J Clin Invest.* 32 : 322-28, 53.
15. Lahey, ME, Gubler, CJ, Cartwright, GE, et al : Studies on copper metabolism, VII Blood copper in pregnancy and various pathologic states. *J Clin Invest.* 32 : 329-39, 53.

16. Markowitz, H, Gubler, CJ, Mahoney, JP, et al : Studies on copper metabolism. XIV. Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patient with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 34 : 1498-508, 55.
17. Pojerova, A and Tovarek, J : Ceruloplasmin in early childhood. *Acta Paediatrica* 49, 113-20, 1960.
18. Raphael, S. Lynch's Medical Laboratory Technology. 3rd ed. Philadelphia : W.B. Saunders Co. 1976. Vol 1. Chap. 8, pp. 227, "The Liver and Biliary System."
19. Raphael, S. Lynch's Medical Laboratory Technology. 3rd ed. Philadelphia : W.B. Saunders Co. 1976. Vol 1. Chap. 10. pp. 345-47, "Copper Metabolism."
20. Ravin, HA : An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J. Lab Clin. Med.* 58 : 161-68, 1961.
21. Scheinberg, IH, Gitlin, D : Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) *Science* 116 : 484-85, 52.
22. Turpin, R, Jerome, H and Schmitt, MH : Study of variations of the ceruloplasmin by an easy technique. *Proc. Roy. Soc. Med.* 46 : 1061-62, 53.