

غلظت سرمی مس، روی و نسبت روی / مس در تشخیص پیش آگهی سرطان پستان

دکتر سید شهاب الدین صدر، دانشیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران
دکتر فرهاد فتحی، دکترای علوم آزمایشگاهی

SERUM COPPER ,ZINC LEVELS AND COPPER/ZINC RATIO AS BIOCHEMICAL MARKERS IN DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF BREAST CANCER PATIENTS ABSTRACT

Serum copper,zinc and the cu/zn ratio were measured in 55 patients with breast disease(20 with benign breast disease and 35 patients with breast cancer) and 30 healthy subjects. The mean serum copper levels were higher in breast cancer than in benign breast diseases (127.5 $\mu\text{g/dl}$) versus 92.4 $\mu\text{g/dl}$ ($P < 0.0005$) and controls (127.5 $\mu\text{g/dl}$ versus (75.6 $\mu\text{g/dl}$) ($P < 0.0005$)

Patients with advanced breast cancer had higher serum copper levels than did patients with early breast cancer (163 $\mu\text{g/dl}$ versus 103.9 $\mu\text{g/dl}$) ($P < 0.0005$).

Patients with advanced breast cancer had lower serum zinc levels than did patients with benign breast disease (68.9 $\mu\text{g/dl}$ versus 135.9 $\mu\text{g/dl}$) ($P < 0.0005$) and controls (68.9 $\mu\text{g/dl}$ versus 129.9 $\mu\text{g/dl}$) ($P < 0.0005$) but no significant difference have seen between serum zinc levels of early and advanced breast cancer patients (68.9 $\mu\text{g/dl}$ versus 72.9 $\mu\text{g/dl}$) ($P < 0.05$).

Serum zinc levels were not decreased in patients with benign breast disease.

چکیده

در ۵۵ بیمار مبتلا به بیماریهای پستان (۲۰ نفر با بیماریهای خوش خیم پستان و ۳۵ نفر مبتلا به سرطان پستان) غلظت‌های مس ، روی و همچنین نسبت روی / مس اندازه‌گیری شد. نتایج این بیماران با نتایج گروه شاهد (مشتمل بر ۳۰ نفر) مقایسه گردید. میانگین غلظت سرمی مس در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با بیماران مبتلا به بیماریهای خوش خیم ، بسیار بالاتر بود (۱۲۷/۵ میکروگرم در دسی لیتر در مقایسه با ۷۵/۶ میکروگرم در

دسی لیتر) ($P < 0.0005$).

بیماران با سرطان پیشرفته غلظت سرمی مس بیشتر در مقایسه با بیماران با سرطان در مراحل اولیه داشتند (۱۶۳ میکروگرم در دسی لیتر در مقایسه با ۱۰۳/۹ میکروگرم در دسی لیتر). ($P < 0.0005$)

بیماران با سرطان پیشرفته همچنین غلظت روی سرمی کمتری نسبت به بیماران ، بیماریهای خوش خیم (۶۸/۹ میکروگرم / دسی لیتر در مقابل ۱۳۵/۹ میکروگرم / دسی لیتر) ($P < 0.0005$)

اندازه‌گیری این عناصر در مایعات بیولوژیکی بعنوان یک پارامتر تشخیصی و نیز پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به سرطان سینه (Breast carcinoma) می‌باشد.

روش کار

مواد شیمیایی و دستگاههای مورد استفاده :

در این تحقیق از مواد شیمیایی زیر استفاده شد:

۱- پودر متال روی

۲- پودر متال مس

۳- پودر اتیلن دی‌آمین تتراسنتیک اسید (EDTA)

۴- اسید نیتریک غلیظ

۵- آب دیونیزه

دستگاه جذب اتمی مورد استفاده دستگاه بيمادزو مدل 680-G بود که مجهز به کوره گرافیتی GTA-4U می‌باشد.

۱) انتخاب بیماران ، جمع آوری نمونه و روشهای آماری:

این تحقیق بر روی ۳۵ بیمار با میانگین سنی 47 ± 9 سال صورت گرفت . همگی این بیماران به تازگی تشخیص داده شده بودند و هیچیک مورد شیمی درمانی و یا رادیوتراپی قرار نگرفته بودند.

نتایج این بیماران با گروه شاهد مشتمل بر ۳۰ نفر (با همان میانگین سنی) و نیز ۲۰ بیمار مبتلا به بیماریهای خوش خیم پستان نظیر فیبروآدنوم ، بیماری فیبروکیستیک ، داکت اکتازی و غیره با میانگین سنی 30 ± 7 سال مقایسه گردید. نمونه‌های خون وریدی این افراد قبل از هرگونه درمان در بین ساعات ۸ تا ۹ پیش از ظهر و بصورت ناشتا (حدود ۸-۶ ساعت ناشتایی) گرفته می‌شد.

از بیماران راجع به سابقه مصرف قرصهای کنتراستپتو و یا بیماریهای کبدی و یا سایر حالاتی که ممکن بود بر نتایج تاثیر بگذارند نظیر آبستنی سوال می‌شد و در صورت مثبت بودن پاسخ این بیماران حذف می‌شد.

مراقبت های معمول در مورد اندازه‌گیری عناصر کمیاب در جمع آوری نمونه رعایت می‌گشت به این ترتیب که نمونه خون در لوله‌های نو و شسته شده با EDTA ۲ درصد و همچنین اسید نیتریک ۱۰-۵ درصد و چند مرحله شستشو با آب دیونیزه، جمع آوری شد. و نمونه‌های همولیز نیز حذف گردید.

نفاوتهای کمی بین غلظت‌های مس ، روی و نیز نسبت مس به روی در گروه‌های مختلف برطبق آزمون t (Student's -t - test) تعیین می‌گردید. (۱)

نتایج آنالیز گروه‌ها بصورت " میانگین " انحراف معیار" بیان می‌شد همچنین سطح معنی دار اختلاف بین میانگینها در حد $P < 0/05$ تعیین شد.

قابلیت تشخیصی آزمونها بر طبق پارامترهای رایج مثل

و همچنین گروه شاهد (۶۸/۹ میکروگرم /دسی لیتر در مقابل ۱۲۹/۹ میکروگرم /دسی لیتر) ($P < 0/0005$) نشان دادند اما از نظر آماری اختلاف معنی داری از نظر غلظت های سرمی روی در بین بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته و بیماران با سرطان در مراحل اولیه مشاهده نشد. (۶۸/۹ میکروگرم /دسی لیتر در برابر ۷۲/۹ میکروگرم /دسی لیتر) ($P < 0/05$)

سطح سرمی روی در بیماران مبتلا به بیماریهای خوش خیم کاهش نشان نمی‌داد.

مقدمه

موضوع نقش عناصر کمیاب در سرطانها مورد توجه بسیاری از محققین قرار دارد. لیکن گزارشات ضد و نقیضی در این زمینه وجود دارد که از جمله مهمترین علت این مسئله را می‌توان اشکالات اندازه‌گیری عناصر کمیاب و نیز مشکلات جمع‌آوری نمونه صحیح و بدون آلودگی خارجی ذکر کرد.

عناصر کمیاب از نظر وزنی مجموعاً کمتر از ۰/۱ درصد وزن تمام بدن را تشکیل داده و بعنوان ترکیبات ضروری در سیستم‌های آنزیمی بیولوژیک و یا پروتئین‌های ساختمانی مورد نیاز بدن هستند.

از جمله عناصری که بعنوان ترکیبات ضروری و مورد نیاز شناخته شده‌اند عبارتند از: آهن ، پد ، فلوراید ، مس ، روی ، منگنز ، قلع ، کوبالت ، کرومیوم ، وانادیوم ، سیلیسیوم و احتمالاً نیکل. عناصر فلزی کمیاب مهمترین نقش شان را بعنوان کوفاکتور در سیستم‌های آنزیمی ایفا می‌کنند.

مس در ساختمان بسیاری از آنزیمهای اکسیداتیو مثل تیروزیناز سرونوپلاسمین ، آمین اکسیداز و سیئوکروم اکسیداز و نیز در گالاکتو ترانسفراز (مسئول بیوسنتز بافت همبند) شرکت می‌کند.

علاوه بر این نشان داده شده است که روی باعث پایداری ریبوزومها و نیز زنجیره دوتایی DNA می‌گردد. محتوای روی در زنجیره DNA و RNA جدا شده از بافت سارکومی پیوند شده به موش بسیار بیشتر از محتوای روی DNA و RNA جدا شده از کبد موشهای سالم است و این مطلب مبین این موضوع است که در روند رشد سلولی روی یک نقش بسیار ضروری را ایفاء می‌کند. برخی مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که نسبت مس به روی در مقایسه با مفادیر روی و مس به تنهایی معیار بهتری در پیش‌آگهی تومورهای بدخیم بدست می‌دهد.

مطالعه حاضر کوششی است به منظور تحقیق اندازه‌گیری مفادیر روی و مس و نیز نسبت مس به روی در پیش‌آگهی و همچنین تعیین شدت بیماری در بیماران مبتلا به سرطان سینه.

هدف

هدف از این مطالعه ارزیابی عناصر کمیاب به ویژه مس و روی از نقطه نظر نقشی که در ایجاد سرطان دارند و همچنین کاربرد

حساسیت (sensitivity)، ویژگی (Specificity)، ارزش قابل پیش بینی مثبت (positive predictive value) مشخص می‌شد. به منظور تعیین پارامترهای فوق واز آنجا که نتایج بصورت مقادیر کمی بودند و نه کیفی، در اینجا لازم بود که مقدار cut off value بین گروه سرطانی و گروه غیر سرطانی (مشمول بر گروه شاهد و گروه مبتلا به بیماریهای خوش خیم) مشخص گردد که به این منظور به مقدار یک انحراف معیار به میانگین غلظت سرمی گروه غیر سرطانی اضافه می‌شد.

تهیه منحنی استاندارد روی

پس از آماده سازی ظروف و وسایل، با استفاده از یک گرم پودر روی متال، استاندارد PPM ۱۰۰۰ روی و با کمک آب دیونیزه و اسید کلریدریک ساخته شد. به کمک این استاندارد، استانداردهای کاری ۵۰۰، ۲۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ (ppb=ng/ml) ساخته شدند. آب دیونیزه دوبار تقطیر شده نیز بعنوان بلانک انتخاب گردید.

هرکدام از استانداردهای روی سه بار و هر بار یک میکرولیتر بطور جداگانه به داخل کوره دستگاه جذب اتمی تزریق می‌شد و از آنجا که مقدار CV (ضریب تغییرات) که به دستگاه داده شده بود ۲۰ درصد تعیین شده بود در صورتی که اختلاف سه به یک حاصله بیشتر یا مساوی ۲۰ درصد بود برای بار چهارم یا پنجم نیز عمل تزریق تکرار می‌گشت.

دستگاه جذب اتمی مورد استفاده، حداکثر قدرت بکارگیری شش استاندارد را دارا بود لذا بین ۶-۴ استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. هر بار مقدار یک میکرولیتر از استاندارد، یا نمونه رقیق شده توسط سمپلر اپندروف به داخل کوره تزریق می‌شد.

پس از اندازه گیریهای مکرر مشخص شد که منحنی کاربری استانداردهای روی، تنها در محدوده حداکثر تا ۴۰ ppb خطی می‌باشد و در غلظت های بالاتر از حالت خطی در می‌آید (شکل ۱)

طول موج انتخابی در مورد عنصر روی ۲۱۳/۹ نانومتر بود. در مورد جذب اتمی روی (چه در مورد استانداردهای مربوطه و چه در مورد نمونه‌ها) هیچگونه جذبی که مربوط به پس زمینه (Back Ground) باشد مشاهده نشد. (شکل ۲)

تهیه منحنی استاندارد مس

در اینجا نیز برای آماده سازی ظروف و وسایل مورد نیاز همانند روی عمل می‌شد. برای تهیه منحنی استاندارد مس، ابتدا غلظت ۱ PPM با استفاده از محلول PPM ۱۰۰۰ که قبلاً ساخته بودیم تهیه شد. با کمک محلول ۱ PPM غلظتهای کاری ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ (ppb) تهیه گردید. منحنی اندازه گیری برای این استانداردها خطی در آمد.

در تهیه منحنی استاندارد مس و همچنین اندازه گیری نمونه‌ها مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه و یا استاندارد توسط سمپلر اپندروف به درون کوره گرافیتی تزریق می‌گشت. در اینجا نیز هر نمونه سربار (اگر ضریب تغییرات بدست آمده زیر ۲۰ درصد را نشان می‌داد) و حداکثر تا ۵ بار (اگر ضریب تغییرات حاصله بیشتر از ۲۰ درصد را نشان می‌داد) به داخل کوره گرافیتی تزریق می‌شد. طول موج انتخابی برای عنصر مس ۳۲۴/۷ نانومتر بود. در مورد مس نیز همانند روی، هیچگونه جذبی مربوطه به پس زمینه مشاهده نمی‌گشت.

تهیه رقت ها

باتوجه به اینکه غلظت متوسط مس و روی در سرم افراد بین ۱۰۰-۲۰۰ $\mu\text{g/d lit}$ می‌باشد و حداکثر غلظت استاندارد در مورد عنصر روی ۴ $\mu\text{g/dlit}$ و در مورد مس ۱۰ $\mu\text{g/d lit}$ تهیه شده بود، میبایستی نمونه‌های سرمی به میزان ۶۰ برابر رقیق می‌شد تا در این محدوده قرار بگیرند. به همین منظور ۵ میکرولیتر از نمونه‌های سرمی به کمک سمپلر اپندروف برداشته و سپس به حجم ۰/۳ میلی لیتر می‌رسانیم.

نتایج

بیماران مبتلا به کارسینوم پستان بطور قابل توجهی غلظت سرمی مس بیشتری را نسبت به گروه شاهد و نیز گروه بیماران مبتلا به بیماریهای خوش خیم نشان می‌دادند (جدول ۱).

گروه	CU	Zn	cu/zn
گروه شاهد (n=20)	۱۹/۲ ± ۷۵/۶ *	۱۲۹/۹ ± ۲۸/۷ *	۰/۶۲ ± ۰/۱۶
گروه بیماران خوش خیم (n=20)	۱۷/۲ ± ۹۲/۳	۱۳۵/۹ ± ۱۸/۸	۰/۶۸ ± ۰/۱۲
گروه بیماران کانسری (n=25)	۳۸/۶ ± ۱۲/۵	۲۲/۱ ± ۷/۶	۰/۶۸ ± ۰/۱۶

مقادیر CU در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *، در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *، در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *، در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *
 مقادیر Zn در برابر اختلاف غیر معنی دار، * در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *، در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *
 مقادیر cu/zn در برابر اختلاف معنی دار، * در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *، در برابر $p < ۰.۰۰۰۵$ *

جدول (۱) غلظت سرمی مس، روی و نسبت مس به روی در گروههای مختلف (دسی لیتر میکروگرم)

در مطالعه حاضر، همانند مطالعات قبلی (۹ و ۱۰) SCL در سرطان پیشرفته (مراحل III و IV) نسبت به مراحل پایین (مراحل II و I) بسیار بالاتر بود. معهذاً SZL نتایج متغیری را نشان می‌داد بطوریکه فقط در سرطان با مراحل پیشرفته بود که SZL کاهش چشمگیری داشت.

نتیجه دیگری که از این تحقیق بدست آمد این بود که نسبت مس به روی در سرم بیماران مبتلا به سرطان سینه به بیماران با بیماریهای خوش خیم و نیز گروه شاهد بطور چشمگیری افزایش داشت. از نظر آماری هم این اختلاف معنی دار بود. از آن گذشته با در نظر گرفتن و در نظر قرار دادن مراحل مختلف سرطان سینه نسبت مس به روی به موازات پیشرفت بیماری، افزایش می‌یافت. در مقایسه بین گروه‌های شاهد و بیماران مبتلا به سرطان سینه، قابلیت تشخیصی اندازه‌گیری نسبت مس به روی با حساسیت ۹۷ درصد، ویژگی ۹۳ درصد، ارزش قابل پیش بینی مثبت ۹۴ درصد و ارزش قابل پیش بینی منفی ۹۶ درصد بدست آمد.

در مقایسه بین گروه بیماران خوش خیم و بیماران مبتلا به سرطان سینه مقادیر این پارامترها به ترتیب ۹۷ درصد، ۷۵ درصد، ۸۷ درصد، ۹۴ درصد بود.

در اینجا تاکید می‌گردد که نسبت مس به روی در موارد بدخیمی‌هایی که با عفونت، بیماریهای کبدی، مصرف قرصهای ضد بارداری خوراکی، و یا سایر حالاتی که می‌توانند در غلظت روی و مس در سرم تاثیر بگذارند می‌بایستی با احتیاط تفسیر گردد. در سابقه بیماران مورد مطالعه ما هیچگونه تاریخچه‌ای از بیماریهای خونی، انفارکتوس میوکارد، اختلالات کلیوی سیروز کبدی، و همچنین حاملگی مشاهده نگردید.

به منظور بررسی تاثیر درمان در غلظت‌های سرمی مس و روی و همچنین نسبت مس به روی از گروه بیماران مبتلا به سرطان، مطالعه سریال بعمل آمد بطوریکه نمونه سرمی این بیماران (حدود ۲۷ بیمار از ۳۵ بیمار) بعد از درمان (که اکثراً ماستکتومی می‌شدند) نیز از نظر مقادیر فوق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌داد که بعد از درمان مقادیر SCL و همچنین نسبت مس به روی کاهش یافته است.

این یافته نیز منطبق بر سایر نتایجی بود که از مطالعات دیگر بدست آمده است (۱۱): مکانیزم افزایش مس در بدخیمی‌ها مشخص نیست ولی می‌تواند مربوط به انهدام و نکرورز یافته‌های مبتلا باشد که منجر به رها شدن مقادیر فراوانی از این عنصر به جریان خون می‌گردد و به همین علت است که در سرطانهای پیشرفته (مراحل III و IV) SCL مقادیر بیشتری را نشان می‌دهد.

هیپوزینکمی که در بیماران سرطانی مشاهده می‌گردد بستگی به ماهیت تئوپلازم دارد زیرا در تئوپلازم بافت‌های غنی از روی نه تنها هیپوزینکمی مشاهده نمی‌شود بلکه این مقدار نیز افزایش نشان می‌دهد.

گروه	Cu	Zn	Cu/Zn
قبل از درمان (n=۳۵)	۱۷۷۶ ± ۳۸۶*	۷۱/۳ ± ۲۲/۱*	۱/۹۷ ± ۰/۹۸*
بعد از درمان (n=۳۷)	۸۶ ± ۲۱/۳	۱۱۷/۲ ± ۱۷/۱†	۰/۷۸ ± ۰/۳۲†

مقادیر Cu: ± در برابر * p < ۰/۰۰۰۵

مقادیر Zn: ± در برابر * p < ۰/۰۰۰۰۵

مقادیر Cu/Zn: ± در برابر * p < ۰/۰۰۰۰۵

جدول ۲ غلظت مس، روی و نسبت مس به روی در بیماران سرطانی در قبل و بعد از درمان (دس لیترمیکروگرم)

نتیجه گیری

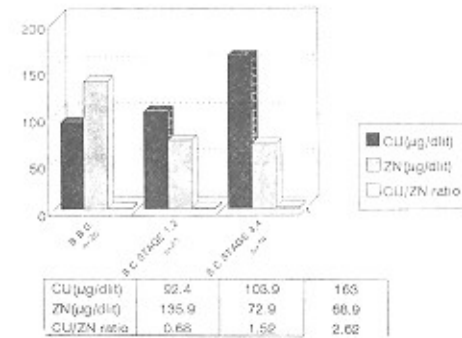
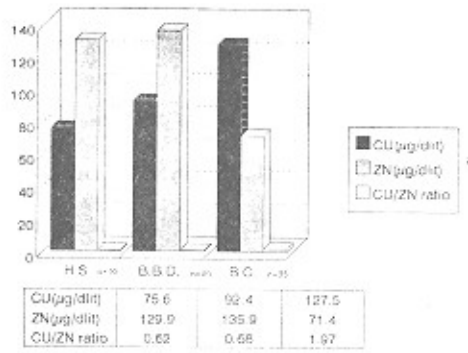
اندازه‌گیری غلظت سرمی مس و همچنین نسبت مس به روی می‌تواند، اندکس بیوشیمیایی ارزشمند، دقیق و حساسی به منظور ارزیابی سیر بالینی بیماری، اثر بخشی درمان و پیش‌آگهی بیماری در بیماران مبتلا به سرطان سینه باشد. علاوه بر علت سهولت اندازه‌گیری و ارزاتر و غیر تهاجمی بودن آن می‌تواند در مطالعات سرنندی (Screening) تومورمارکرها نیز ارزشمند باشد.

بحث

امروزه در مطالعه بدخیمی‌ها توجه خاصی نسبت به ارزیابی و تجسس بیومارکرها مبذول می‌شود. ثابت شده است که تغییرات غلظتهای هموستاتیک عناصر کمیاب در تعداد متنوعی از سرطانها می‌تواند در ارزیابی شدت و همچنین پیش‌آگهی بیماری مفید واقع گردد (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷) (نتایج حاصل از این رساله نشان داد که گروه شاهد نسبت به گروه بیماران سرطانی دارای مقادیر روی سرمی بیشتر و از طرف دیگر مقادیر کمتری از مس سرمی بودند.

بیماران با بیماریهای خوش خیم از نظر غلظت‌های سرمی مس و روی موقعیت بینابینی را نسبت به گروه کنترل از یک طرف و گروه بیماران سرطانی از طرف دیگر اشغال می‌کردند.

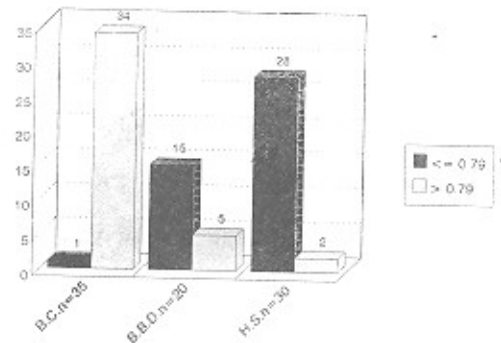
نتایج ما از این تحقیق با نتایجی که از تحقیقات دیگر در مورد افزایش غلظت سرمی مس (SCL) و کاهش SZL در بیماران مبتلا به سرطان سینه بدست آمده همخوانی نشان می‌دهد اما با مطالعاتی که مؤید ثابت ماندن مقادیر (SCL) و SZL می‌باشد مغایرت دارد (۸)



نمودار شماره (۱) غلظت سرمی مس و روی و نسبت Cu/Zn در گروه‌های مختلف.

نمودار شماره (۱) غلظت سرمی مس و روی و نسبت Cu/Zn در گروه بیمارستان سرطان و خوش خیم

نمودار شماره (۳) گروه بیمارستان و نسبت Cu/Zn



مراجع

1. Stites Dp, Terr. Al. Basic and clinical Immunology; 1991; 7 th edition.
2. Schwartz M.K. Role of trace elements in cancer; Cancer Research 1975; 35 : 2481-87.
3. Alexander FW, Delves H, Lay H. Plasma copper and zinc in adult leukemia. Arch dis child 1972; 47:671-677.
4. Jigyasu M, Teshmeh T, Thomas FB, Fuller L, M. significance of serum copper levels in adult patient with Hodgkin disease : Cancer 1976; 31 :1337-1347.
5. Inutsuka S, Araki, S. Plasma copper and zinc levels in patients with malignant tumors of digestive organs . cancer 1978; 42 : 626-631.
6. Santoliquido PM , Southwick HW , Olwin JH. Trace metal levels in cancer of the breast . Surg Gynecol Obstet 1976; 142:65-70.
7. Issell BF , Mac Eadyen BV, Gum ET , Valdivieso Dudrick Serum Zinc levels in lung cancer patients. Cancer 1981; 47:1845-1848.
8. Garofalo JA, Ashikari H, Lesser LM. Serum zinc and copper and Cu/Zn ratio in patient with benign and malignant breast lesion. Cancer 1980; 46: 2682-2685.
9. Capel D , Pinnock MH, Williams DC, Hanham IWF: Serum levels of some trace and bulk elements in cancer patients. Oncology 1982; 39: 38-41.
10. Sharma UR, Khetarpal A Gupta R. Trace metals in disease of the breast .Ind.J.Surg 1984; 46:194-203.
11. Perlin E, Frattali V, Robertson R. Serum copper levels in malignancy. Milit Med 1978; 143:875-77.
12. Robbins S.L., Kumar V, Basic pathology :4 th edition 1987.
13. Briggs MH, Garciarweis P, Wallace L, Briggs, M: Zinc deficiency in man. Lancet. 1973; 2:1396.
14. N.W Tietz . Fundamentals of clinical chemistry . 3th edition 1987.
15. Burr, R.G. Plasma Zinc levels. Lancet 1974; 1 :879.
16. Lightman , A, Brandes J.M, Binur N, Drugan A, Zander O Use of the serum copper/Zinc ratio in the differential diagnosis of ovarian malignancy . clin chem. 1986; 32(1):101-103
17. Fisher GL, Byers VS, Shitrine M, Levin As. Copper and zinc levels in serum from patients with sarcoma. cancer 1976; 37: 356-363.
18. Cavallo F, Gerber M, Marubini E, Richardson S. Zinc and copper in breast cancer . Cancer 1991; 67 : 738-745.
19. Miatto O C, usari LM , Gabriell G, Nicoli N , Bellisola G. fibrinogen in hepatic carcinoma. Cancer 1985; 55: 774- 8.
20. Gray BN, Walker G, Barnard R. Use of serum copper/ zinc ratio in patient with large bowel cancer. J Surg oncol 1982; 21: 230-232.