

การวัดระดับโปรเจสเทอโรนในซีรัมของสตรีระหว่างรอบประจำเดือน
และสตรีมีครรภ์ โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซย์



นางคันสนีย์ ทุกิยะโพธิ

004981

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2517

ESTIMATION OF PROGESTERONE LEVELS IN SERUM BY A
RADIOIMMUNOASSAY METHOD DURING THE MENSTRUAL
CYCLE AND PREGNANCY.



Mrs Sansanee Dutiyabodhi

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University

1974

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิตศึกษา

B.N. Saxena

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

B.N. Saxena ประธานกรรมการ
Badr Nath Saxena กรรมการ
Shyam Singh กรรมการ
Dr. B.N. Saxena กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย

Dr. B.N. Saxena, M.D.

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวัดระดับโปรเจสเทอโรนในซีรัมของสตรีระหว่างรอบประจำ
เดือนและสตรีมีครรภ์ โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

ชื่อ นางสาวศันสนีย์ ทุติยะโพธิ แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2517

บทคัดย่อ

โปรเจสเทอโรนเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ส่วนใหญ่สร้างขึ้นโดยรังไข่และ
อวัยวะคอร์เทกซ์(adrenal cortex) ของสตรีเพศที่ไม่ตั้งครรภ์ ระดับของ
โปรเจสเทอโรนจะทำในระหว่างระยะ follicular และสูงสุดในระยะ luteal
ของรอบประจำเดือน ส่วนในสตรีมีครรภ์นั้น รกจะเป็นแหล่งสำคัญในการสร้าง
โปรเจสเทอโรนเมื่อเทียบกับอวัยวะของทารก รังไข่กับอวัยวะของมารดา และสาร
ตัวต้น(precursor) สำคัญในการสังเคราะห์โปรเจสเทอโรนในระหว่างตั้งครรภ์
คือ โคเลสเตอรอล(cholesterol) ของมารดา (Diczfalusy, 1968)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา การวัดระดับโปรเจสเทอโรนในซีรัม โดยวิธีเรดิโอ-
อิมมูโนแอสเสย์ โดยใช้ แอนติบอดีต่อโปรเจสเทอโรนที่จำเพาะ ซึ่งได้มาจากการฉีด
11 α - hydroxyprogesterone hemisuccinate ที่รวมกับ bovine serum
albumin เข้าในแกะตัวเมีย (Mikhail, 1972) การวัดระดับโปรเจสเทอโรน
ใช้แอนติบอดีที่ได้เมื่อ 6 เดือนหลัง immunization และความเข้มข้นสุดท้ายเป็น
1 : 28,000 อินคิวเบทกับ progesterone-1,2-³H ที่ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 18-24
ชม. และแยกฮอร์โมนที่อิสระออกจากฮอร์โมนที่จับกับแอนติบอดีด้วยสารละลายผงถ่าน
ที่เคลือบด้วยเดกซ์ทราน(dextran) ความเข้มข้น 0.625% ความไวในการวัด
เปลี่ยนแปลงระหว่าง 10 และ 25 พิโคกรัม/0.5 มิลลิลิตร การหาความถูกต้องของ
วิธีทดลองพบว่า ภาวะของโปรเจสเทอโรนในซีรัมสูงกว่า 300 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นไป
การวัดจะอยู่ในระดับเชื่อถือได้ คือ recovery อยู่ระหว่าง 88.2 - 104.2 %



ส่วนความแม่นยำในการวัด ทั้งในการทดลองเดียวกัน (within-assay) และทดลองต่างวันกันเป็นเวลา 3 วัน (between-assay) นั้น สัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (coefficient of variation) มีค่าต่ำกว่า 10% จากการศึกษาความจำเพาะในการวัดพบว่า สเตียรอยด์ฮอร์โมนต่าง ๆ ที่นำมาศึกษาไม่รบกวนการจับของโปรเจสเตอโรนมาตรฐานกับแอนติบอดี

ในระยะ follicular และระยะ luteal ของรอบประจำเดือน ค่าเฉลี่ยของระดับโปรเจสเตอโรนที่วัดได้เท่ากับ 0.54 ± 0.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 6.31 ± 2.47 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในสตรีที่รับประทาน Norgestrel ปริมาณ 0.03 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นยาคุมกำเนิดพบว่า 9 ใน 10 คน จะมีระดับโปรเจสเตอโรนต่ำ (0.2 - 2.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ระหว่างรับประทานยา เพียง 1 คน ที่พบระดับของโปรเจสเตอโรนสูง (16.3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) บ่งให้ทราบว่ามี การตกไข่ และมีการทำงานของคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ส่วนในระยะ ตั้งครรภ์นั้น ค่าเฉลี่ยของระดับโปรเจสเตอโรนแตกต่างกันไปตามระยะต่าง ๆ ของการ ตั้งครรภ์ คือ มีค่า 17.20 ± 6.24 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตั้งครรภ์ได้ 4 - 8 สัปดาห์, 62.00 ± 36.10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตั้งครรภ์ได้ 16 - 28 สัปดาห์, 169.48 ± 52.71 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อตั้งครรภ์ได้ 32 - 38 สัปดาห์ และมีค่า 177.76 ± 4.36 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนดคลอด ส่วนในระยะหลังคลอดนั้น ระดับของ โปรเจสเตอโรนจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับปกติประมาณ 1.68 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ภายใน 116 ชั่วโมง ภายหลังจากคลอด

Thesis Title Estimation of Progesterone Levels in
 Serum by a Radioimmunoassay Method
 During the Menstrual Cycle and Pregnancy.
Name Mrs Sansanee Dutiyabodhi
Department Biochemistry
Academic Year 1974

ABSTRACT

Progesterone is a steroid hormone which is mainly produced by the ovary and the adrenal cortex in non-pregnant women. The level of progesterone is low during the follicular phase of the menstrual cycle and rises to a maximum level in the luteal phase. During pregnancy, the placenta is quantitatively the major site of progesterone biosynthesis as compared to the fetal adrenals and maternal ovaries and adrenals. Maternal cholesterol is the major precursor of the progesterone biosynthesis during pregnancy (Diczfalusy, 1968).

A radioimmunoassay for measuring progesterone was standardized using specific progesterone antibody obtained by immunizing an ewe with 11α -hydroxyprogesterone hemisuccinate conjugated to bovine serum albumin (Mikhail, 1972). The antibody obtained 6 months after the immunization was used at a final concentration of 1:28,000 and incubated with progesterone- $1,2$ - ^3H

for 18-24 hours at 4°C. Separation of free from bound progesterone was achieved by using 0.625% suspension of dextran-coated charcoal. The sensitivity of the method varied between 10-25 pg/0.5 ml of progesterone. The accuracy of added progesterone was found to be satisfactory, with a percentage recovery of 38.2-104.2% if the level of progesterone in serum was higher than 300 pg/ml. The coefficients of variation of both within and between-assay precision were lower than 10%. The specificity study indicated that none of the steroids tested interfered with the binding between standard progesterone and its antibody.

During the follicular and luteal phase of the menstrual cycle, the mean levels of serum progesterone were found to be 0.54 ± 0.04 ng/ml and 6.31 ± 2.47 ng/ml respectively. In ten women taking Norgestrel at a dose of 0.03 mg/day as contraceptive pills, it was found that nine subjects showed low levels of progesterone ranging from 0.2 to 2.0 ng/ml, only one subject possessed high levels (16.3 ng/ml) of progesterone indicated an ovulation and functioning corpus luteum. During pregnancy, the mean serum levels of progesterone varied with the stages of pregnancy, being 17.20 ± 6.24 ng/ml at 4-8 weeks of gestation, 62.00 ± 36.10 ng/ml at 16-28 weeks, 169.48 ± 52.71 ng/ml at 32-38 weeks and 177.76 ± 4.36 ng/ml at term. During the postpartum period, progesterone level decreased rapidly after delivery reaching a level of 1.68 ng/ml within 116 hours after the delivery.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author should like to acknowledge her very special sincere appreciation to Dr B.N. Saxena, Consultant Endocrinologist WHO Research Team, Bangkok (1972-1974) for his supervision and constructive criticisms throughout this study.

Thanks are also due to grants from the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University under Dr Nikorn Dusitsin for providing facilities and materials to be included.

The author also wish to express her gratitude to Dr Varapan Danutra of Biochemistry Department for her informative comments and interest on this work.

Among the persons to whom the author would like to thank in particular are Mr Smai Leepipatpaiboon who provided estradiol determinations and Miss Ratana Sindhuphak for her many helpful suggestions and also Miss Yenchit Luvira for her valuable assistance. Thanks also go to Mr Vitoon Chaichanwattanakul who have been most generous in providing illustrations presenting in this thesis. The author is also indebted to Miss Ubol Wongthongkam for typing the entire work.

The author is also grateful to the Graduate School of Chulalongkorn University for a grant to support this work leading to the completion of the thesis.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATION	xii
CHAPTER	
1 INTRODUCTION	1
2 MATERIAL AND METHODS	19
3 RESULTS	33
4. DISCUSSION	61
5 CONCLUSION	74
REFERENCES	77
VITA	87

LIST OF TABLES

Table	Page
1 The effect of temperature and time of incubation	35
2 Percentage recovery of progesterone added into 1 ml of serum	45
3 Precision of measuring progesterone levels in pooled serum within-assay	46
4 Precision of measuring progesterone levels in pooled serum between-assay	47
5 Progesterone levels during different phases of normal menstrual cycle	50
6 Levels of serum progesterone during various stages of pregnancy	50
7 Serum progesterone and estradiol levels in Norgestrel-treated subjects	53
8 Levels of serum progesterone during the postpartum period	59
9 Serum progesterone levels in normal menstruating subjects (during follicular and luteal phase) and in different stages of pregnancy observed in this study compared to those observed by other investigators using similar technique	59 a

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Structure of progesterone	1
2.	Biosynthesis pathway of progesterone	2
3.	" " "	3
4.	Metabolic pathways of progesterone	8
5.	Pathways of steroid biosynthesis showing the key position of progesterone	10
6.	Fundamental principle of RIA	16
7.	Progesterone antibody titre study	34
8.	Effect of different concentrations of charcoal on the progesterone standard curve .	38
9.	} Specificity studies of progesterone antiserum	40
10.		41
11.		42
12.	The sensitivity of standard curve	43
13.	} Progesterone levels during the normal menstrual cycle	51
14.		
15.		
16.		
17.	Progesterone levels during pregnancy	58
18.	Progesterone levels during the postpartum period	60

ABBREVIATION

<u>Trivial name</u>	<u>Systematic name</u>
1. Progesterone	1. Pregn-4-ene-3,20-dione
2. 16 α -hydroxyprogesterone	2. 16 α -hydroxypregn-4-ene-3, 20-dione
3. 17 α -hydroxyprogesterone	3. 17 α -hydroxypregn-4-ene-3, 20-dione
4. 20 α -dihydroprogesterone	4. 20 α -hydroxypregn-4-ene-3-one
5. 20 β -dihydroprogesterone	5. 20 β -hydroxypregn-4-ene-3-one
6. Pregnenolone	6. 3 β -hydroxypregn-5-en-20-one
7. Corticosterone	7. 11 β ,21-dihydroxypregn-4-ene-3, 20-dione
8. Cortisol	8. 11 β , 17 α , 21-trihydroxypregn- 4-ene-3, 20-dione
9. Testosterone	9. 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one
10. Androstenedione	10. Androst-4-ene-3, 17-dione
11. Estradiol	11. Estra-1, 3, 5 (10)-trien-3, 17 β -diol
12. Estrone	12. 3-hydroxyestra-1, 3, 5 (10)- trien-17-one
13. Estriol	13. Estra-1, 3, 5 (10)-trien-3, 16 α , 17 β -triol

<u>Trivial name</u>	<u>Systematic name</u>
14. Pregnanediol	14. 3β -Pregnane- 3α , 20α -dione
15. Norgestrel	15. 13β -ethyl 17α -ethynyl- 17β -hydroxyon-4-ene-3-one.
16. Pregnanedione	16. 5β -Pregnane-3, 20-dione
17. Pregnanolone	17. 3α -Hydroxy- 5β -pregnan-20-one
18. Allo-pregnanediol	18. 5α -Pregnane 3α , 20α -diol and 5α -Pregnane 3β , 20α -diol

(From Diczfalusy, 1968)