

TEMEL TIP BİLİMLERİ

Biyokimya

Progesteron Tayin Yöntemleri

Yrd. Doç.Dr.Duran DEMİRCİ*
Doç.Dr.Şerif AKMAN*
Uz.Dr.Kadirhan SUNGUROĞLU*
Prof.Dr.Levent KARACA*

Progesteron ovaryumlarda, adrenal korteksde ve plasentada A¹- pregnonolondan sentezlenen bir hormondur. Progesteronun idrardaki başlıca metaboliti pregnanodioldur.

Progesteron aktivitesini tayin etmek için geliştirilmiş ilk yöntem "Fare Uterus bioassay"idir. Bu yöntem 1947'de Hooker ve Forbes tarafından geliştirilmiştir (1). Daha sonraları kantitatif kimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar sırasıyla 2,4-dinitrofenylhidrazin türevi ölçüm yöntemi (2), 240 nm de spektrofotometrik ölçüm esasına dayalı olan yöntem (3), sülfirik asit kromojen yöntemi (4), floresans (5,6; ve tiyosemikarbozid türevleri içeren yöntemlerdir (7). Steroidlerin izotoplarla işaretlenmesi ve türev bileşiklerinin elde edilmesi ile ilgili gelişmelere paralel olarak plazma progesteron seviyelerinin ölçümünde "double-isotope derivatization technique" kullanılmıştır. Woolever ve Goldfen (8) ¹⁴C-progeseteron ve ³H- borotritidi; kendi "double-isotopassay" lerinde kullanmışlardır. Bir başka yaklaşım ise ³⁵S tiyosemikarbozid ve ³H-progesteron'un izotop olarak kullanıldığı ve sabit bir izotop oranını elde etmek için birçok kromatografik basamak ve asetillenmeyi içeren yöntemdir (9).

Progeseteron analizinde doğrusalılığı arttırmak ve daha hızlı sonuç alabilmek için gaz kromatografik teknikler uygulanmıştır. Plazma progesteron analizinin gaz kromatografisinde yapılabilmesi için progesteronun uygulanmadan önce ekstra edilmesi ve saflaştırılması gerektiği için bu amaçla çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Örneğin Yannone ve arkadaşları (10) plazma progesteron seviyesini "flame ionization" deteksiyon sistemini içeren gaz kromatografisi ile tayin etmek için önce plazma progesteronunu çeşitli solventler kullanarak ekstre etmiş sonra daha ileri saflaştırma için kağıt kromatografisine uygulamışlardır. Gaz kromatografisi için yeterli saflıkta ekstrakt elde edebilmek için plazmayı önceden "Celite Kolon Kromatografisine" ve ince tabaka kromatografisine uygulayan yöntemler (11) yanında bu amaçla önce ince tabaka kromatografisi ve asetille-

meyi takiben ikinci bir kromatografiyi kullanan yöntemler de mevcuttur (12). Progesteronun m-kloroasetat türevinin kullanıldığı "elektron capture detection" sistemi içeren gaz kromatografisi (13) veya "progesteron-O-metiloksim" nin bir azot detektör ile birlikte kullanıldığı gaz kromatografik yöntemler (14) rapor edilmiştir.

Progesteron seviyelerinin tayininde "competitive protein binding" (CPB) tekniğinin Neil ve arkadaşları tarafından uygulanmasından sonra (15) çok çeşitli ekstraksiyon solventlerin farklı kaynaklı bağlayıcı proteinleri, trityumla işaretli farklı steroidleri ve serbest ve proteine bağlı steroid fraksiyonlarının ayrılmasında kullanılan çok çeşitli teknikler içeren yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin bazılarında progesteron önce serumdan saflaştırılmakta ve daha sonra CPB analizine tabi tutulmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda ya trityumla işaretlenmiş kortikosteron (15-21) veya progesteron (22-24) radioaktif steroid olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu CPB yöntemlerinde kullanılan kortikosteroid bağlayan protein de çok çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir. Bunların başlıcaları östrojen veya dexametazon verilmiş kadınların serumları (17,18,21,24) 3. trimestirdeki hamile bir kadının serum (16) ve köpek, tavuk, kobay, domuz plazmalarıdır (15,20,22,23). Progesteron ekstraksiyonunda kullanılan solventler; petrol eteri (K.D.: 40°-60°C) (15-18,21,23) etil asetat (20), hexan (16) ve dietil eter (21,24)dir. Bazı yayınlar "protein-binding assay"de kullanılmak üzere hazırlanan ekstraktların kromatografik olarak saflaştırılmasının interfere edici steroidlerden temizlenmesi amacı ile çok gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla kullanılan kromatografiler ince tabaka, silica-gel (15,17,24), kağıt (20) ve celite kolon (21) kromatografileridir. Bazı araştırmacılar ise kaba ve saflaştırılmış ekstraktlar arasında belirgin bir farkın olmadığını rapor etmişlerdir (16,22,23,25). Serbest veya proteine bağlı fraksiyonların separasyonu; Florisol (aktif magnezyum silikat 60-200 mesh) (15-22). Sephadex (24) veya "dextran-coated charcoal" (23) gibi absorbe edici maddeler vasıtası ile yapılmıştır.

* GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD, ANKARA

Radioimmünoassay (RIA) ile plazma progesteron seviyeleri ilk defa Abraham ve arkadaşları (26) sonra da Furuyama ve Nuhent (25) tarafından tayin edilmiştir. Üfindan sonra çok farklı ekstraksiyon kromatografik saflaştırma çeşitli radioaktif steroidlerin antikorumları ve separasyonlarını içeren yöntemler geliştirilmiştir (27-36).

Başlangıçtaki RIA metodlarının çoğunluğu indirekt yöntemler olup selektif olarak progesteronun plazmadan ekstraksiyonunu içermektedirler. Bu yöntemlerde dietil eter (26,27,35-37) petrol eteri (29-31,33) veya hexan (25,28) ekstraksiyonu kullanılmıştır. Ekstraktın daha ileri purifikasyonu için celite (26,35) Alumina (25,29,37) veya sephadex LH-20 kolon kromatografileri (28,30,31,34,36) kullanılmıştır.

Fakat bazı araştırmacılar (29,30,32,35) sadece solvent ekstraktını kullanan RIA sonuçlarının kromatografik saflaştırmayı içerenlerden çok farklı olmadığını iddia etmişlerdir.

Gene başlangıçtaki immünoassayler de bir ve ikinci pozisyondan trityum işaretli progesteron (28,31-34) daha sonrakilerde ise 1,2,6,7- H progesterone (27,29,30, 35,36) kullanılmışlardır. Son zamanlarda ise ekonomik avantajları ve çok büyük miktarlarda örneğin çalışma rahatlığı nedeniyle çeşitli ¹²⁵I-radioligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Scarisbrick ve Cameron (38) progesteron -11-hemisüksinil (¹²⁵I) iyodohistamin ve progesteron-3-(0-karboksimetil-oksimo)(¹²⁵I)iodohistamin hazırlamış ve RIA da kullanarak sonuçları yorumlamışlardır. Kullanılan diğer bazı radyoyodür ihtiva eden progesteron türevleri iyodohistamin tiramin, tiramin glukuronid ve tirozin metil esterleri içermektedirler (39-43). Çeşitli köprü veya bağlanmaları yoluyla meydana getirilmiş radio aktif işaretli progesteron türevleri (ister antikor üretiminde kullanılan immünojene homolog veya heterolog olsun) gerek poliklonal gerekse de monoklonal antikorumlarla değişik özgüllükte veya duyarlılıkta olmaktadır.

Progesteron testleri için kullanılan antikorum elde edilmesinde en çok albumine bağlı "11a -hidroksiprogesteron hemisüksinat" (27-36) kullanılmasına rağmen 6 veya 7. pozisyona bağlı türevlerin de buna eşit özgüllükte ve duyarlılıkta antikor üretmekte oldukları

gözlenmiştir. Bu türevler her zaman 3 ve 20. pozisyondan albumine bağlı progesterondan daha üstün antikorumlar oluşturmaktadırlar (42,44).

Dextran-coated charcoal" (26,29-31,33,35,36) Amonyum sülfat (25,43) ve "double antibody" (42) teknikleri serbest ve bağlı fraksiyonları ayırmak için en çok kullanılan maddelerdir. Antikorum cama ve mikrokristal selüloza bağlanması yoluyla elde edilen progesteron katı faz immünoassayleri mevcuttur (45,46).

Şayet progesteron testi direk serumda uygulanırsa serumda bulunan "Corticosteroid-binding globulin" (CBG) progesteron bağlamak için testte kullanılan antikorla yapışacak ve testin duyarlılığını ve doğruluğunu yanlış olarak etkiyelecektir. Bunu gidermek için ortama progesteronun CBG tarafından bağlanmasını önleyecek bloke edici ajanlar ilave edilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılanlar danazol (17a -pregn-4-en-20-ynol (2,3-d) isoxazol-17-51) (32) kortizol (47) ve ANS (8-aniline-1-naftalen sulfonik asit) (38) dir.

Son zamanlarda birçok literatür progesteron için nonizotopik yöntemlerden bahsetmektedir. Bu yöntemler uzun süre dayanıklı olan radioaktif artıklara neden olmayan reaktifleri içerdiklerinden oldukça ilgi toplanmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri enzim immünoassaylerdir. Bunlar "P -galactosidase" (48) "Horse radish peroxidase" (HRP) (49,50) veya "steroid- A'-izomeraz (35) gibi enzimlerin progesterona bağlanması yoluyla elde edilen konjugatları içermektedirler.

Allman ve arkadaşları "progesterone-3-carboxymethylloxime" in fluoresceinamine bağlanmasıyla elde edilen fluorescein işaretli antigeni immuno fluorometrik bir yöntemde kullanmışlardır (51) Bir başka fluoresans test ise "time-resolved fluoro immünoassay" olup bu yöntemde "europium" işaretli antikorumlar kullanılmaktadır (52).

Progesteronun non-izotopik olarak ölçümünde kullanılan bir diğer yöntemde kemilüminasandır. Minimum deteksiyon limiti 0.1 femtomol olan ve "isoluminol" işaretli progesteron içeren bir kemilüminasans "Competitive protein binding assay" progesteron için geliştirilmiştir (53). Aynı yöntemin antikoru poliakrilamid boncuklara bağlanmış bir direk katı-faz, modifikasyonu da yayınlanmıştır (54).

KAYNAKLAR

1. Hooker CW, and Forbes TR. A bioassay for minute of progesterone. *Endocrinology* 1947; 41:158-69.
2. Zander J, and Simmer H. Die Chimische Bestimmung von progesterone in organischen substraten. *Klin. Woch. Enschr* 1954; 32:529-40.
3. Short RV. The chemical estimation of progesterone in peripheral blood. *J Endocrinol* 1958; 16:415-25.
4. Oertel GW, Weiss SP, and Eile-Nes KB. Determination of progesterone in human blood plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1959; 19:213-8.
5. Heap RB. A fluorescence assay for progesterone. *J Endocrinol* 1964; 30:293-305.
6. Short RV, and Levett I. The fluorometric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and menstrual cycle. *J Endocrinol* 1962; 25:239-44.
7. Sounmerville IF, Pickett MT, Collins WP, and Denger DC. A modified method for the quantitative determination of progesterone in human plasma. *Acta Endocrinol* 1963; 43:101-9.

8. Woolemer CA, and Goldfien A. A double isotope derivative method for plasma progesterone assay. *Int J Appl Radiat* 1963;14:163-71.
9. Roindel A, Tait JF, Tait SAS, et al. Estimation of progesterone in human peripheral blood using ¹⁴S-thiosemi-carbozide. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:229-42.
10. Yannone MG, McComas DB and Goldfien A. The assay of plasma progesterone. *J Gas Chromatogr* 1964; 2:30-3.
11. Van der Molen HJ, and Groen D. Determination of progesterone in human peripheral plasma using gas-liquid chromatography with electron capture. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:1625-39.
12. Lurie AO, Ville CA, and Raid DSE. Progesterone in blood: A quantitative methods employing gas-liquid chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1966; 26:742-9.
13. Wyman H, and Sommerville IF. The description and evaluation of a simple technique for the determination of plasma progesterone by thin-layer and gas- liquid chromatography. *Steroids* 1968; 12:63-8.
14. Frith RG, and Phillipou G. Measurement of plasma progesterone and its O-methylexime by gas chromatography-nitrogen detection. *Ann Clin Biochem* 1981; 18:84-7.
15. Neill JD, Johansson EDB, Datta JK, and Knobil E. Relationship between plasma levels and luteinizing hormone and progesterone during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; 27:1167-73.
16. Demetron JA, and Austin FG. A rapid competitive protein binding assay for plasma progesterone. *Clin Chem Acta* 1971; 33:21-32.
17. De Souza MLA, Willianson HO, Moody LO, and Diczfalusy E. Further assament of the reliability of progesterone assays by competitive protein binding. *Acta Endocrinol* 1970; (Suppl 147)64:171-83.
18. Johansson EDB. Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal menstrual cycle measured by a rapid competitive binding technique. *Acta Endocrinol* 1969; 61:592-606.
19. Lurie AO, and Patterson RJ. Progesterone in non pregnancy: An assay for the clinical chemistry laboratory. *Clin Chem* 1970; 16:856-60,
20. Martin BT, Cooke BA, and Black WP. Evaluation of a rapid method for the measurement of plasma progesterone by competitive protein binding. *J Endocrinol* 1970; 46:369-77.
21. Stone S, Nakanura RM, Mishell Jr DR, and Thorneycroft IH. A modified technique for the assay of progesterone in blood using celite column chromatography. *Steroids* 1971; 17:411-22.
22. Horth CE, and Palmer RF. Measurement of progesterone in human plasma. *Clin Endocrinol* 1972; 1:199-207.
23. Pichon MF, and Milgrom E. Competitive protein binding assay of progesterone without chromatography. *Steroids* 1973; 21:335-46.
24. Yoshimi T, and Lipsett MB. The measurement of plasma progesterone. *Steroids* 1968; 11:527-40.
25. Furuyam S, and Nugent CA. A radioimmunoassay for progesterone. *Steroids* 1971; 17:663-74.
26. Abraham GE, SwerdloffR, Tulchinsky D, and Odell WD. Radioimmunoassay of progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32:619-24.
27. Aso T, Guerrero R, Cekan A, and Diczfalusy E. A rapid 5 hour radioimmunoassay of progesterone and estradiol in human plasma. *Clin Endocrinol* 1975; 4:173-82.
28. Calabresi E, Pazzzagli M, Fiorelli G, et al. Determination of progesterone in human plasma by radioimmunoassay. *J Nucl Biol Med* 1974; 18:30-7.
29. Cameron EDH, and Scarisbrick JJ. Radioimmunoassay of progesterone. *Clin Chem* 1973; 19:1403-8.
30. De Villa GO, Roberts K, Wiest WG, et al. A specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35:458-60.
31. Lebel M, and Grosse JH. A rapid and precise method for measurement of physiological variations of human plasma progesterone. *J Steroid Biochem* 1978; 9:989-93.
32. McGinley R, and Casey JR. Analysis of pregesterone in unextiacted serum: A method using danazol a blocker of steroid binding to proteins. *Steroids* 1979; 33:127-38.
33. Morgan CA, and Cooke ID. A comparison of the competitive protein binding assay and radioimmunoassay for plasma progesterone during the normal menstrual cycle. *J Endocrinol* 1972; 54:445-56.
34. Tea NT, Castainer M, Roger M, and Scholler R. Simultaneous radioimmunoassay of plasma progesterone and 17-hydroxy progesterone normal values in children, in men and women throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Steroid Biochem* 1975; 6:1509-16.
35. Terouanne B, Marchand J, Calzolari C, et al. Centrifugal analyzer used for enzyme immunoassay of progesterone and choriomamotropin. *Clin Chem* 1982; 29:302-404.
36. Youssefnejian E, Florensa E, Collins WP, and Sommer Ville IF. Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Steroid Biochem* 1972; 3:893-901.
37. Kutas M, Ching A, Bartos D, and Castro A. A simple progesterone radioimmunoassay without column chromatography. *Steroids* 1972; 20:697-716.
38. Scarisbrick JJ, and Cameron EHD. Radioimmunoassay of progesterone: Comparison of (1,2,6,7-³H)-progesterone and progesterone, (¹²⁵I)-iodohistamine radioligands. *J Steroid Biochem* 1975;6:51-6.
39. Allen RM, and Redshaw MR. The use of homologous and heterologous ¹²⁵I-radioligands in the radioimmunoassay of progesterone. *Steroids* 1978; 32:467-87.
40. Brochu M, Veilleux R, Lorrain A, and Belanger A. Monoclonal antibodies for use with ¹²⁵Iodine labelled radioligands in progesterone radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* 1984; 21:4405-11.

41. Corrie JET, Hunter WM, and Macpherson JS. A strategy for radioimmunoassay of plasma progesterone with use of a homologous site ¹²⁵I-labelled progesterone. Clin Chem 1981; 27:594-9.
42. Nise Wander GD. Influence of the site of conjugation the specificity of antibodies to progesterone. Steroids 1973; 22:413-24.
43. Scott JZ, Stanczyk FZ, Gobelsmann U, and Mishell Jr. DR. A double antibody radioimmunoassay for serum progesterone using progesterone - 3 - (O-carboxymethyl) - Oxini-(¹²⁵I) iodohistamine as radioligand. Steroids 1978; 31:393-405.
44. Bauminger S, Lindner HR, and Weinstein A. Properties of antisera to progesterone and to 17-hydroxyprogesterone elicited by immunization with the steroids attached to protein through position 7. Steroids 1973; 21:847-56.
45. Bodley FH. Chapdelaine using antibodies covalently linked to acrylamideglass beads. Steroids 1973; 21:1-13.
46. Catt KJ, and Tregear GW. Solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. Science 1967; 158:1570-1.
47. Haynes SP, Corcoran JM, Eastman CJ, and Doy FA. Radioimmunoassay of progesterone in unextracted plasma. Clin Chem 1980; 26:1607-9.
48. Dray F, Andrien JM, and Renand F. Enzyme immunoassay of progesterone at picogram level using (3-galactosidase as a label. Biochem. Biophys Acta 1975; 403:131-8.
49. Joice BG, Read GF, Fahney DR. A specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. Steroids 1977; 29:761-70.
50. Joyce BG, Othich AH, Read GF. et al. A sensitive specific solid phase enzyme immunoassay for plasma progesterone. Ann Clin Biochem 1981; 18:42-7.
51. Allman BL, Short F, and James VHT. Fluoroimmunoassay of progesterone in human serum or plasma. Clin Chem 1981;27:1176-9.
52. Lourigen T, Hemmila I. Pettersson K, et al. Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay. Talanta 1984; 31:909-16.
53. Konen F, Pazzagli M, Kim JB, et al. An assay procedure for plasma progesterone based on antibody-en-homced chemiluminescence FEBS letters. 1979; 104:201-205.
54. De Boever J, Kolen F, Vanderkerckckhone D, and VanMade G. Solidphase chemiluminescence immunoassay for progesterone in unextracted serum. Clin Chem 1984; 30:1637-41.