

'n Nuwe Metode vir die Bepaling van Serotonien in Bloed en Serebrospinale Vloeistof

J. A. KRIEK, A. J. BESTER, J. J. ROSSOUW

SUMMARY

A new rapid method for the microdetermination of serotonin (5-hydroxytryptamine) in plasma and cerebrospinal fluid is described. A recovery coefficient of 98% was obtained in the present method, with the use of [³H]-hydroxytryptamine creatinine sulphate as an internal standard, compared with recovery coefficients of 31% and 66% for the two existing methods generally used for serotonin determination. This method involves a one-step sample deproteinization by perchloric acid, resulting in a high stability of serotonin.

S. Afr. med. J., 55, 260 (1979).

Gedurende die afgelope 26 jaar het biogeniese amiene aansienlike aandag geniet.¹ Klem is veral op die moontlike verwantskap tussen hierdie amiene en verskeie farmaseutiese middels gelê. Alhoewel die aksie en verwantskap tussen serotonergiese produkte en karsinogenese, anafilakse, migraine en neurologiese afwykings ook onder die soeklig was, moet heelwat onsekerhede nog opgeklaar word.² Tydens geïnduseerde bloedstolling en geassosieerde plaatjieaggregasie word serotonien (5-hidroksitriptamien) (5-HT) vrygestel.³ Hierdie vasoaktiewe stof word tans met die skoksindroom geassosieer en in die Departement van Chirurgie, Fakulteit van Geneeskunde, Universiteit van Stellenbosch, ondersoek.

Teenswoordig word daar egter reeds algemeen aanvaar dat abnormale vlakke van 5-HT met die onbehandelde karsinoom of neurologiese afwyking geassosieer kan word.^{4,5} Die rol van 5-HT as 'n neurohumorale oordragmiddel is reeds bekend, en die gebruik van ekstraserebrale indikatore van breinserotonienfunksie word tans ondersoek en krities geëvalueer.^{6,7}

Betreffende serotonergiese afwykings en die korrekte aanwending van farmaseutiese middels, is die beskikbaarheid van 'n goeie patologiese beeld uiters noodsaaklik. Die bepaling van 5-HT in bloed en serebrospinale vloeistof (SSV) is dus van kardinale belang. Die geneesheer kan hier 'n baie groot bydrae lewer deur die patologiese beeld van verskeie neurologiese en hematologiese toestande te definieer.

MNR Eenheid vir Molekulêre en Sellulêre Kardiologie, Universiteit van Stellenbosch en Tygerberg-hospitaal, Parowvallei, KP

J. A. KRIEK, B.SC. HONS

A. J. BESTER, M.SC., PH.D., PH.D. (MED. WET.)

Departement Kardiotorakale Chirurgie, Universiteit van Stellenbosch en Tygerberg-hospitaal, Parowvallei, KP

J. J. ROSSOUW, B.SC., M.B. CH.B.

Ontvangsdatum: 24 Augustus 1978.

Die bestaande metodes vir die bepaling van 5-HT, sowel as hierdie metode, maak ook gebruik van die totale 5-hidroksie-indoolvlak. Weens tydrowende prosedures, lae herwinningskoëffisiënte en relatiewe groot volumes bloed, asook uit 'n ekonomiese oogpunt, is hierdie metodes nie op 'n roetinebasis uitvoerbaar nie.⁸⁻¹¹ Die bestaande metodes maak ook op baie hoë herwinningskoëffisiënte aanspraak, maar is deur radiometriese ekstraksies met behulp van [³H]-serotonien-kreatiniensulfaat ([³H]-5-HTKS) as ondergeskik aan hierdie nuwe metode bewys.

Die metode wat hier beskryf word, is nie alleen op bloed nie, maar ook direk op die SSV van toepassing. Weens sy maklike uitvoerbaarheid, hoë herwinningskoëffisiënt en dupliseerbaarheid kan hierdie bepaling in enige kliniese laboratorium as roetinediens aangebied word.

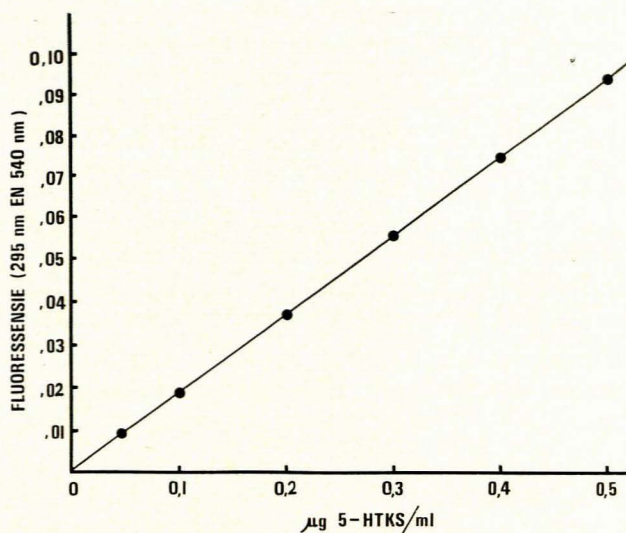
MATERIAAL

Om konsekwente dupliseerbaarheid te verseker, is dubbelgedistilleerde gedeïoniseerde water by alle reagentse gebruik. Perchloorsuur (Merck, Darmstadt, Wes-Duitsland), standaard-5-HTKS (10 µg/ml) (Merck), [³H]-5-HTKS sulfaat (Radiochemical Centre, Amersham, Engeland), standaard 2,5 ml dikalium-etileendiamien-tetra-asynsuur (K₂-EDTA)-buis, en 'n Aminco Bowman-spektrofluorofotometer is gebruik.

METODES

5-HT in Bloed

Vars veneuse bloed is by manlike bobbejane (*Papio ursinus*) en by 2 vroulike en 18 manlike studente tussen die ouderdomme van 18 - 24 jaar geneem. Die monsters is in 2,5 ml K₂EDTA-buis geplaas en dadelik goed gemeng. Elke monster is in 'n skoon plastieksentrifugeerbuis oorgegooi en teen 3 000 g vir 5 minute gesentrifugeer. By 1,0 ml van die plasma is 1,0 ml 10% (g/v) perchloorsuur gevoeg, en na 15 minute op ys is die gedatureerde proteïene vir 5 minute teen 10 000 g gesedimenteer. Met behulp van 'n pasteurpipet is ongeveer 1,0 ml van die helder supernatant versigtig in 'n kwartskuvet geplaas. Die aktiverings- en emissiegolflengtes is by 295 nm en 540 nm onderskeidelik in 'n Aminco Bowman-spektrofluorofotometer bepaal. As standaard is 11,9 mg 5-HTKS in 500 ml van die 5% (g/v) perchloorsuuroplossing opgelos om 'n konsentrasie van 10 µg/ml van die vry basis te gee. 'n Standaardkurwe (Afb. 1) is bepaal deur 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 5,0 ml van die standaard-5-HTKS-oplossing te neem en dit met 'n 5% (g/v) perchloorsuuroplossing tot 100 ml op te maak. Die fluoressensie is soos voorheen bepaal.



Afb. 1. Lineêre verwantskap tussen 5-HTKS en relatiewe fluoressensiewaardes.

5-HT in SSV

Monsters is deur middel van lumbaalpunksies van 15 pasiënte van Tygerberg-hospitaal verkry. Gelyke volumes SSV en 10% (g/v) perchloorsuur is in plastieksentrifugeerbuis gemeng, en na 10 minute op ys is die monsters vir 5 minute teen 10 000 g gesentrifugeer. Die helder supernatant is versigtig, met behulp van 'n pasteurpipet, in 'n kwartskuvet geplaas en die fluoressensie is bepaal. Soms is so min as 0,5 ml SSV gebruik, en die bepaling is dan met behulp van 'n mikrokwartskuvet gedoen. Dit is nie noodsaaklik om die SSV in K₂EDTA-buis te versamel nie, aangesien 5-HT baie stabiel in die SSV is.¹²

Herwinning van [³H]-5-HTKS

Die herwinning van [³H]-5-HTKS is met behulp van die nuwe en bestaande metodes vergelyk. In alle gevalle is ekwimolare konsentrasies van [³H]-5-HTKS by die toets- en kontrolemonsters gevoeg. Die voorgeskrewe metodes van ekstraksie^{8,9} is streng nagevolg, en die herwinningskoëffisiënte van die finale toetsmateriaal is met behulp van die kontroleresultate bepaal. In beide die toets- en kontrolemonsters is onderskeidelik 0,5 ml van die geëkstraheerde materiaal en 0,5 ml van die supernatant (na perchloorsuur-deproteïnisering) met 5,9 ml Insta Gel gemeng, en die radioaktiwiteit (ipm) is in 'n Packard Tri-carb-vloeistofsintillasiesteller bepaal. Ter vergelyking is

bloed van die femorale vene van 'n mannetjebobbejaan (*P. ursinus*) getrek en vir alle metodes gebruik.

RESULTATE

5-HT in Bloed

Die fluorometriese bepaling van 5-HT in plasma uit bobbejaan (*Papio ursinus*)- en mensbloed berei, was onderskeidelik $0,312 \pm 0,021 \mu\text{g/ml}$ ($N = 20$) en $0,240 \pm 0,004 \mu\text{g/ml}$ ($N = 20$). Die 5-HT-vlakke van die studente vergelyk goed met dié in die literatuur (0,2 - 0,3 $\mu\text{g/ml}$), maar betreffende 5-HT-vlakke van bobbejane is geen waardes beskikbaar nie.^{4,5,8,9}

5-HT in SSV

Die fluorometriese bepaling van 5-HT in SSV van 15 pasiënte was gemiddeld $0,194 \pm 0,024 \mu\text{g/ml}$. Hierdie waarde kan egter nie as 'n normale gemiddelde beskou word nie, aangesien die mediese geskiedenis van die pasiënte nie met hulle ooreenstemmende 5-HT-vlakke gekorreleer is nie. Verdere navorsing op hierdie gebied is dus nodig.

Herwinning van [³H]-5-HTKS

Ten einde die waarde vir die kwantitatiewe bepaling van 5-HT van die onderskeie gepubliseerde metodes^{8,9} te evalueer, is dit noodsaaklik om hul onderskeie herwinningskoëffisiënte met dié van die beskryfde metode te vergelyk. Aangesien nie alleen 5-HT by 295 nm en 540 nm fluoesseer nie, maar ook alle 5-hidroksie-indole, is [³H]-gemerkte 5-HTKS as interne standaard gebruik ten einde die kwantitatiewe van die betrokke metodes te evalueer. In Tabel I word die verkreeë radiometriese resultate uiteengesit. Metodes A⁸ en B⁹ het herwinningskoëffisiënte van 31,3% en 65,5% onderskeidelik, vergeleke met 'n doeltreffendheid van 97,7% van die nuut ontwikkelde metode.

BESPREKING

Die behoefte om 'n vinnige en maklik uitvoerbare metode met 'n hoë herwinningskoëffisiënt te ontwikkel, was noodsaaklik. Die bestaande metodes is nie alleen tydrowend nie, maar behels ook veelvuldige organiese oplosmiddel-ekstraksie, wat 'n verlies van 5-HT tot gevolg het. Die nuut ontwikkelde metode behels 'n enkel-stap deproteïnisering deur middel van perchloorsuur, met feitlik geen verlies aan 5-HT-inhoud nie. Die gebruik van perchloorsuur as 'n deproteïniseringsreagens is ongetwyfeld die bepalende faktor by die maklike uitvoerbaarheid en hoë doeltreffendheid van hierdie metode. Perchloorsuur stabiliseer nie al-

TABEL I. RADIOMETRIESE HERWINNING VAN [³H]-5-HTKS

	Metode A	Metode B	Nuwe metode
Interne standaard (ipm)	31 594	237 800	713 127
Gemiddelde herwinning (ipm)	$9\ 890 \pm 579$	$156\ 265 \pm 532$	$696\ 445 \pm 3\ 719$
Herwinning (%)	31,30	65,45	97,66

leen 5-HT nie, maar denatureer ook die plasmaproteïene onomkeerbaar, insluitende monoamienoksidase (hierdie ensiem is betrokke by die oksidatiewe deaminasie van 5-HT), en lei derhalwe tot 'n verhoging in die sensitiviteit van die metode. Perchloorsuur toon geen fluoressensie by 295 nm en 540 nm nie, terwyl trichloroasynsuur ('n ander deproteïneringsreagens) 'n baie hoë fluoressensie by bogenoemde golflengtes besit. Alhoewel die fluoressensie van die monsters, soos in hierdie metode beskryf, onmiddellik na deproteïnering bepaal was, kon geen verlies in die fluoressensie van duplikaatmonsters 24 uur ná deproteïnering aangetoon word nie.

Die Departement Radiologie, Tygerberg-hospitaal, en mnr. T. Zuurmond van die Primaatkolonie, Karl Bremer-hospitaal, word graag bedank.

VERWYSINGS

1. Maickel, R. P., Cox, R. H., Saillant, J. *et al.* (1968): *Int. J. Neuropharmacol.*, **7**, 275.
2. Hardebo, J. E., Edvinsson, L., Owman, C. H. *et al.* (1978): *Neurology (Minneapolis)*, **28**, 64.
3. Fésüs, L., Csaba, B. en Muszbek, L. (1977): *Clin. exp. Immunol.*, **27**, 512.
4. Garelis, E., Gillew, J. C., Wyatt, R. J. *et al.* (1975): *Amer. J. Psychiatry*, **132**, 2.
5. Pare, C. M. B., Sandler, M. en Stacey, R. S. (1960): *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **23**, 341.
6. Segal, D. S., Yager, J. en Sullivan, J. L. (1976): *Foundations of Biochemical Psychiatry*, p. 16 Londen: Butterworths.
7. Saavedra, J. M. (1977): *Fed. Proc.*, **36**, 2134.
8. Yuwiler, A., Plotkin, S., Geller, E. *et al.* (1970): *Biochem. Med.*, **3**, 426.
9. Geeraerts, F., Schimpffessel, L. en Crokaert, R. (1974): *Experientia (Basel)*, **30**, 837.
10. Strauss, H. W., Smith, R. B., Polimeni, P. *et al.* (1967): *Angiology*, **18**, 535.
11. Hardisty, R. M. en Stacey, R. S. (1955): *J. Physiol. (Lond.)*, **130**, 711.
12. Garattini, S. en Valzelli, L. (1965): *Serotonin*, 1ste uitg., p. 9. Amsterdam: Elsevier.

Eosinophilic Fasciitis

A Case Report

I. M. CHALMERS, K. D. BHOOLA, I. PARSOO

SUMMARY

We describe a patient with a scleroderma-like illness which involved the arms and legs but not the face and hands. Clinical, laboratory and histological features were those of the recently described syndrome, eosinophilic fasciitis. This rare condition is worthy of note because it appears to have a much better prognosis than conventional scleroderma, and because it responds very well to corticosteroid therapy.

S. Afr. med. J., **55**, 262 (1979).

The term scleroderma covers a wide spectrum of clinical entities from lethal progressive systemic sclerosis to benign and limited forms such as morphea and acrosclerosis.¹ Recently, Shulman^{2,3} described another benign scleroderma-like syndrome, and Rodnan *et al.*^{4,5} proposed that it be named eosinophilic fasciitis. It is characterized by thickening and inflammation of the deep subcutaneous fascia, most commonly of the forearms, and by an absence of visceral involvement and Raynaud's phenomenon. Peripheral blood eosinophilia and hypergammaglobulinaemia are present but antinuclear antibodies and rheumatoid factors are absent.

The condition commonly responds to corticosteroids, sometimes dramatically.⁶

We report another example of this condition in a young woman whose disease conformed to the published descriptions of eosinophilic fasciitis.

CASE REPORT

A 22-year-old Indian woman was admitted to hospital 2 months after the onset of her illness, which started suddenly with swelling of the legs, arms and face. She could not recall any strenuous muscular effort preceding her illness. The swelling gradually subsided over a period of 2 weeks but was replaced by induration and patchy hyperpigmentation of the skin on her arms and legs but not on her face. She rapidly became disabled by pain and loss of mobility of the affected parts, and 2 days before admission she had to give up her work. There was no history of Raynaud's phenomenon, dysphagia or other symptoms of visceral involvement.

Examination revealed abnormalities confined to the skin and musculoskeletal system. Patchy areas of hyperpigmentation were evident on the limbs, but not on the face, neck and trunk. The limbs had a 'woody' feel which appeared to be the result of induration of subcutaneous tissue. The overlying skin was slightly thickened, but mobile and soft, with preservation of hair and sweat glands. Fingers and toes were not involved, and proximally the induration appeared to terminate a short distance from the shoulders and hips with no clear demarcation between normal and affected areas. The indurated areas were slightly tender and

Departments of Medicine and Pathology, University of Natal and King Edward VIII Hospital, Durban

I. M. CHALMERS, B.S.C. HONS, M.B. CH.B., M.R.C.P.
K. D. BHOOLA, B.S.C., M.B. B.CH., B.A.O., L.A.H.
I. PARSOO, M.B. CH.B.

Date received: 6 September 1978.