

A-E, EPSPs recorded intracellularly from RN cell. A and B, EPSP induced from the sensorimotor cortex (upper traces). Lower traces are field potentials taken just after withdrawal. C and D, EPSP from the internal capsule. Voltage scale of 5 mV applies to A-D. E, EPSP from the interposed nucleus of the cerebellum. F-H, EPSPs in another RN cell induced from the interposed nucleus (IP) and the internal capsule (IC). Upward arrows mark the moments of their stimulation. F, control. G, during passage of hyperpolarizing currents of $4 \cdot 10^{-9}$ A. H, $8 \cdot 10^{-9}$ A. All records were taken by superposing about 20 faint traces. I, ordinates, amplitudes of the IP-evoked EPSPs (open circles) and IC-induced ones (closed circles). Abscissae, intensity of applied currents. J illustrates the sites from which the maximum EPSP was induced in each RN neurone.

finding that the cortico-rubral fibres end in the neuropil of the red nucleus where abundant axo-dendritic contacts exist². The slow time-course of the EPSP is explicable through consideration of the cable properties of dendrites.

Zusammenfassung. Elektrische Reizung des sensorimotorischen Kortex ruft monosynaptische EPSPs, in den grossen Zellen des N. ruber der Katze hervor (RN-Zellen). Die kortikalen Punkte, von denen EPSPs hervorgerufen werden können, sind somatotopisch so angeordnet, dass sie mit der histologischen Projektion der kortiko-rubralen Fasern übereinstimmen. Membran-Hyperpolarisierung, die stark genug ist, um EPSPs vom N. inter-

positus zu vergrössern, hat keinen Einfluss auf Amplituden oder Zeitfluss von cerebral hervorgerufenen EPSPs. Es wird daraus geschlossen, dass kortiko-rubrale Fasern synaptischen Kontakt mit den Dendriten von RN-Zellen machen.

N. TSUKAHARA⁵ and K. KOSAKA

Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo (Japan), November 22, 1965.

⁵ Present address: Department of Physiology, New York Medical College, New York.

PRO EXPERIMENTIS

Bestimmung der freien Hexosamine in Serum und Harn

Glukosamin und Galaktosamin sind wichtige Bausteine von Glykoproteiden und Mukopolysacchariden. Ihre Bestimmung befasst sich meistens mit den proteingebundenen, durch saure Hydrolyse abspaltbaren Aminozuckern¹⁻³. Der Erfassung der freien Hexosamine des Serums wird daher weniger Beachtung geschenkt, zumal man durch ihre relativ hohe Einbaugeschwindigkeit in die Glykoproteide eine verwertbare Messgrösse für den Aminohexosenmetabolismus zu haben glaubt⁴. Im diabetischen Stoffwechselgeschehen interessiert hierbei, inwieweit Glukose vermehrt in Glukosamin umwandelbar ist und hierbei besonders bei Glukosehaushaltsstörungen

infolge Insulinmangel. SPIRO⁵ nimmt an, dass der glykolytisch dekompenzierte diabetische Stoffwechsel die Neubildung von Glukosamin bevorzugt, bzw. bei Blockade aller anderen Abbauege die Glukoseutilisation nur noch in Richtung zum Glukosamin verläuft.

¹ L. A. ELSON and T. J. MORGAN, *Biochem. J.* 27, 1824 (1933).

² K. HINSBERG und K. LANG, *Medizinische Chemie* (Urban und Schwarzenberg 1957).

³ S. GARDELL, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis VI* (Interscience Publishers, New York 1959).

⁴ R. G. SPIRO, *J. biol. Chem.* 234, 742 (1959).

⁵ R. G. SPIRO, *New Engl. J. Med.* 269, 616 (1963).

Die Erfassung geringer Hexosaminmengen ist nach der üblichen Methode von ELSON und MORGAN¹ schwierig durchführbar. Die zu erwartenden Mengen liegen unterhalb des Erfassungsbereiches.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Wahl der Enteiweissungsreagenzien. Säuren, wie Perchlor-, Trichloressig- oder Salicylsäure spalten die Glykosidbindung. Im alkalischen Bereich (Zinksulfat und Bariumhydroxyd) ist mit einer schnellen Verharzung zu rechnen. Für die Weiterführung der Reaktion erreicht man im alkoholischen Milieu keine genügend hohe Reaktionstemperatur, um die Ringschlussreaktion zum Pyrrolderivat quantitativ ablaufen zu lassen. Wir haben daher versucht, mit Hilfe des Kationenaustauschers Wofatit KPS eine Anreicherung der Aminosucker herbeizuführen, ohne, wie bei dem Verfahren von Boas⁶ eine unnötige Verdünnung zu erhalten. Ausserdem ist die Säulenchromatographie zeitraubend. Die Bindung der Hexosamine ist quantitativ. Das Harz kann auch durch Regenerieren mit 2*n* Natronlauge, 2*n* Salzsäure und Nachwaschen mit Wasser wieder verwendet werden.

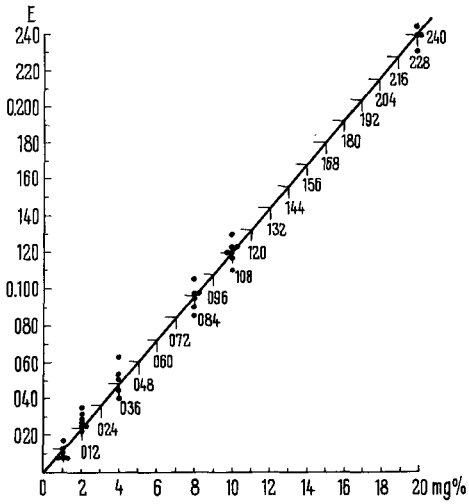
Methode. Nach dem Enteiweissen der Probe von 0,5 ml Serum mit Äthanol (96%) wird mit 4 ml Äthanol nachgewaschen und bis 10 ml aufgefüllt. Man durchmischt mit 2 g KPS, zentrifugiert nach 20 min und eluiert den Bodensatz mit 2 ml 2*n* HCl. 1 ml des harzfreien Überstands neutralisiert man mit 1 ml 2*n* Sodalösung, fügt 2 ml Acetylacetonreagenz (0,75 ml Acetylaceton in 25 ml 1,25*n* Sodalösung) hinzu und erhitzt genau 20 min. Nach schnellem Abkühlen werden 2 ml Ehrlich's Reagenz (1,6 g *p*-N-Dimethylaminobenzaldehyd + 30 ml konzentrierte Salzsäure + 30 ml Äthanol) dazu gegeben und nach frühestens 45 min am Eppendorf bei 536 nm und 2 cm Schichtdicke photometriert. Für den Leerwert verwendet man 0,5 ml Wasser.

Eichkurve. 60,2 mg Glukosaminhydrochlorid ad 50 ml entsprechen 100 mg% Glukosamin. Die Fehlerbreite der Methode beträgt $\pm 0,13$ mg% (Figur).

Ergebnisse. Als vorläufiges Ergebnis wird eine enge Beziehung zwischen der Höhe des Blutzuckers und der Konzentration an freien Hexosaminen im Serum gefunden. Die Normalwerte, bestimmt bei 10 Stoffwechselgesunden, liegen bei $2,8 \pm 0,3$ mg%. Je nach der Schwere der Glukoseutilisationsstörung ist auch der Hexosaminspiegel unterschiedlich hoch, aber deutlich oberhalb des Normalbereichs: 7,2 mg% (Mittelwert aus 10 Bestimmungen bei Diabetes mellitus). Im Bereich schwerster Stoffwechseldekompensationen (diabetisches Coma) finden wir Werte um 20 mg%. Infolge grösserer Insulinansprechbarkeit, bzw. gesteigerter Utilisation durch die α_2 - und β -Globulinsynthese sind die Hexosamine bei der diabetischen Angiopathie wieder vermindert und erreichen fast normale Werte. Die Hyperhexosaminämie ist wie die Hyperglykämie harnpflichtig.

Gleiche Verhältnisse lassen sich beim langfristig alloxandiabetischen Kaninchen nachweisen. Das normale Tier hat einen mittleren Hexosaminspiegel von $3,1 \pm 0,11$ mg% bei einem durchschnittlichen Blutzucker von 116

$\pm 3,44$ mg% (*n* = 12). Bei Hyperglykämie liegen diese Werte über (6,6/317), im hypoglykämischen Zustand unter (1,66/50) dem Normalwert.



Eichkurve zur Bestimmung der freien Hexosamine im Serum: 20 mg% entsprechen einer Extinktion von 0,240.

Glykosurie- gruppen	Mittelwert Glu- kose enzymatisch %	Mittelwert Hexosamine mg%	<i>n</i>
> 2%	3,10	44,7	13
1-2%	1,54	29,1	11
< 1%	0,38	6,0	10

Summary. A modified method of determining free hexosamines in serum is reported. A correlation was found between the intensity of the disturbance of glucose metabolism and the level of free hexosamines in blood.

K.-J. BÄHNER

*Institut für Diabetesforschung und -behandlung
«Gerhardt Katsch», Karlsburg (Kreis
Greifswald, DDR), 16. August 1965.*

⁶ N. F. Boas, J. biol. Chem. 204, 523 (1953).