23. Studien über intrazelluläre Wasserstoffionen-konzentration.

I. Zur Methodik.

Von Juntaro OGAWA.

Med. Klinik von Prof. R. Inada, Kaiserliche Universität, Tokyo.

(Rec. Feb. 5, 1928. Comm. by K. MIURA, M.I.A., Feb. 12, 1928.)

Schon früher wurde einiges über Untersuchungen der $[H^+]$ im Gewebe unter verschiedenen Bedingungen mitgeteilt. Bei den weiteren Studien über die intrazelluläre Wasserstoffionenkonzentration wurde nun zunächst die *Schmidtmannsche* Methode nachgeprüft, wieweit man mit derselben korrekt arbeiten kann und welche Umstände man besonders zu berücksichtigen hat.

Um von der Zellfärbung mittelst des Indikators auf den intrazellulären pH-Wert zu schließen vergleicht *Schmidtmann* Zellfärbungen mit Kontrollfärbungen in der Weise, dass er kleine Tröpfchen von Puffermischungen verschiedener pH-Reihe auf ein Deckglas aufträgt und in denselben kleine Indikatorkörnchen einlegt, dann die auftretenden Farbennuancen mit den zu prüfenden Zellfärbungen vergleicht. Doch ist es ziemlich zeitraubend, bei jeder Untersuchung solche Vergleichsproben anzustellen und die Zellfärbung erleidet während dieses Fristes auch oft gewisse Veränderung. Es wäre daher vorteilhafter, dauernd haltbare Modelle der Indikatorfarben verschiedener pH-Reihe anzufertigen. Als einen vorläufigen Ersatz eines solchen Modells wurde eine besondere Tabelle verfertigt, worin die Indikatorfärbungen verschiedener pH-Reihen genau bezeichnet sind. Alle Prozeduren sind bei dieser Tabelle genau nach den Angaben *Schmidtmanns* ausgeführt und die an bestimmten pH-Reihen zu beobachtenden Farbennuancen sind übersichtlich dargestellt. Der Gebrauch der Tabelle ist also ganz ähnlich wie bei der *Gräffschen* Methode, nur kann man die Farbennuancen noch feiner abstufen, als bei der *Gräffschen* Tabelle. Wenn man erst etwas Übung im Ablesen der Farbnuancen der Indikatorfärbungen erlangt hat, so findet man die zu untersuchenden Farben leicht aus dieser Tabelle heraus. Es bildet natürlich einen Nachteil, dass subjektive Momente bei dieser Prüfungsmethode mit im Spiele kommen; dennoch ist es möglich, mittelst dieser Methode die intrazelluläre $[H^+]$ zu messen. Durch Übung und Gebrauch von

geeigneten Indikatoren gelang es mir, Unterschiede von pH 0,1 — 0,2 aufzudecken.

In meiner früheren Arbeit erwähnte ich, dass die $[H^+]$ der Gewebe, gemessen nach der *Gräffschen* Methode, sich während des Zeitablaufs allmählich nach der sauren Seite hin verschiebt und diese Verschiebung sich bereits 40 Minuten nach der Gewebsentnahme ziemlich deutlich erkennbar wird. Diese Säuregradzunahme geschieht jedoch in der Zelle selbst viel schneller und stärker als im Gewebe als ganzes. Selbst wenn man Gewebsstücke in Ringer-Lösung hält, bemerkt man schon nach 20-30 Minuten eine deutliche Zunahme der intrazellulären $[H^+]$, nämlich um etwa pH 0,3.

Zellen	intrazelluläre pH-Werte nach verschiedenem Zeitablauf.									
	2 min.	5	10	15	20	25	30	35	40	50
Quergest. Muskel		6.8		6.7 — 6.6		6.5			6.3 — 6.5	
„	6.9	6.8 — 7.0	6.9		6.8		6.6	6.4	6.5	6.5
Herzmuskel			7.1 — 7.2		6.9					6.6 — 6.5
Leberzelle		7.1		6.9 — 7.0			6.8			

Obige Tabelle wurde mit zerzupftem Material gemacht. Beim Zerzupfen muss man aber mit der grössten Vorsicht vorgehen: ist doch schon seit langem bekannt, dass durch mechanische Reize, welche das Gewebe bei der Messung der $[H^+]$ von Gewebsextrakten erleidet, eine Gewebssäuerung hervorgerufen wird. Auf Grund dieser Erwägungen erschien es mir fraglich, wie weit man mit Gefrierschnitten bei den Untersuchungen der physiologischen intrazellulären $[H^+]$ arbeiten darf. Es wurde deswegen eine Prüfung der Einflüsse von Gefrierschnitten auf die intrazelluläre $[H^+]$ vorgenommen, indem ich einerseits mit Gefrierschnitten und andererseits gleichzeitig mit Zupfpräparaten in Ringerlösung die $[H^+]$ mass. Als Versuchsobjekte wurden Ganglienzellen vom Vorderhorn des Rückenmarks, quergestreifte Muskeln, Herzmuskel und auch Leberzellen verwendet. Von den Gefrierschnitten erzielte ich dabei fast immer viel niedrigere pH-Werte als von den Zupfpräparaten, wenn ich auch ausnahmsweise einmal von beiden fast gleiche Werte erhielt. Aus diesen Ergebnissen ist also zu schliessen, dass durch den Gefrierschnitt eine Zunahme der $[H^+]$ in der Zelle hervorgerufen wird, welche von den physiologischen intrazellulären pH-Werten ziemlich weit entfernt ist. Schliesslich verglich ich noch diese Methode mit der *Gräffschen*. In die Muskelzellen von

Mäusen wurden Indikatorkörnchen eingebracht und dieses Gewebe gleichzeitig mit der *Gräffschen* Methode bestimmt.

Zelle	Indikator	Zeitablauf nach Entnahme	pH (intrazellular)	pH des Gewebs als Ganzes (n. Gräff Methode)
Herzmuskel	Bromkresol- purpur	10 min.	6.5	7.1
do	do	10 min.	6.2	6.5
Quergest. muskel	Bromthymal- blau	10 min.	7.1	7.1
do	do	26 min.	6.5	7.2
do	do	40 min.	6.7	7.2

War die Reaktion im Beginn des Versuchs auf der alkalischen Seite, so zeigten beide Methoden fast gleiche pH-Werte; war jedoch die Reaktion ziemlich sauer, so waren die Ergebnisse beider Methoden von einander abweichend. Die $[H^+]$ in der Zelle ist, nach der *Schmidtmannschen* Methode ziemlich gross, dennoch zeigte die *Gräffsche* Methode noch etwas höhere pH-Werte. Dies rührt vielleicht daher, dass bei der *Gräffschen* Methode die Puffer-Substanzen nicht nur von Zellen, sondern auch aus Gewebssäften herkommen.