

KAMIENIE MIŁOWE W CHEMII KLINICZNEJ
MILESTONES IN CLINICAL CHEMISTRY

Katarzyna Klimasz, Przemysław J. Tomasik*

*Zakład Biochemii Klinicznej Instytut Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Wielicka 265, Kraków
e-mail: p.tomasik@uj.edu.pl

Mgr Katarzyna Klimasz, technik analityki medycznej; zainteresowania badawcze: początki diagnostyki laboratoryjnej jako samodzielnej dyscypliny, historia laboratoriów analitycznych we wiodących ośrodkach naukowych (Kraków, Lwów, Wilno, Warszawa, Poznań) ze szczególnym uwzględnieniem laboratoriów przy szpitalach pediatrycznych, rozwój badań analitycznych od czasów starożytnych do teraźniejszości.

dr hab. n. med. Przemysław Tomasik – adiunkt w Zakładzie Biochemii Klinicznej Instytutu Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Autor ponad 80 publikacji naukowych. Zainteresowania: gastroenterologia dziecięca i diagnostyka laboratoryjna oraz diagnostyka *in vitro* w miejscu opieki nad pacjentem.

ABSTRACT

clinical chemistry is the science on the border of the two disciplines: medicine and chemistry. It is defined as the application of the chemistry in the study of biological samples in order to diagnose, treat, cure diseases as well as in monitoring and prognosis [1]. Development of clinical chemistry is dated on the 19th century. Biuret test, and a method for detection of sugar in the urine were then described, also blood gases were extracted [13, 17]. In the mid of 19th century blood could be analyzed for the presence of potassium, sodium, phosphorus and calcium [31]. In the second half of 19th century Duboscq built first colorimeter. This model was widely adapted in laboratories and was in use till the 20-ties of 20th century [44]. Colorimetry also became the most popular technique in the clinical chemistry. In the 80ties of 19th century was developed a method for estimating the concentration of creatinine and detection of bilirubin [36, 39]. Increasing number of available laboratory tests resulted in the separation laboratory diagnostic as a distinguish branch of science. At the beginning of 20th century has been introduced quantitative analytical methods for determination of ammonia, urea, creatinine, cholesterol, uric acid, nitrogen, phosphorus, and chloride in biological fluids as well as measurements of blood gases. In 1930 was introduced clinical enzymology with the first method for assessing the activity of alkaline phosphatase. In the mid of 20th century in the medical laboratories routinely were measured amylase, lipase, acid and alkaline phosphatase, phosphocreatine kinase, alanine and asparagine aminotransferases [78, 79]. Development of electrical engineering and computing resulted with intensive development of laboratory instruments. First automated spectrophotometer was invented in 1957 (Autoanalyzer, Technicon company). In 1970, Automatic Clinical Analyzer f. Du Pont was able to perform determinations in any configurations not as so far in the series [99].

Keywords: clinical chemistry, glucose, protein, enzymes, colorimetry

Słowa kluczowe: chemia kliniczna, glukoza, białko, enzymy, kolorymetria

Chemia kliniczna jest nauką z pogranicza dwóch dyscyplin, medycyny i chemii. Może być definiowana jako zastosowanie metodyki chemicznej w badaniu materiału biologicznego w celu diagnostyki, leczenia chorób, monitorowania ich przebiegu oraz prognozowania [1]. O ile początki alchemii w medycynie datują się na starożytność to intensywny rozwój chemii klinicznej obserwujemy w czasach nam współczesnych. Wiąże się to z postępem w biologii, chemii i fizyce ale też w inżynierii, programowaniu komputerowym, nanotechnologiach.

Opisując rozwój metod analitycznych w chemii klinicznej nie sposób nie wspomnieć o paru kluczowych postaciach. Phillipus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493–1541) znany jako Paracelsus, jako pierwszy próbował połączyć dwie dyscypliny naukowe: chemię, a właściwie alchemię i medycynę. Medycyna chemiczna, znana też jako jatrochemia lub chemiatria (ιατρος (iatros) – to po grecku lekarz) skupiała się głównie na leczeniu chorób za pomocą związków chemicznych. Paracelsus rozwinął także techniki ilościowego wykonywania badań ogólnych moczu.[2] Johann Babtist van Helmont (1579–1644) flamandzki lekarz i chemik, uważany za twórcę chemii fizjologicznej zwrócił uwagę na proces trawienia, który według niego był wynikiem naturalnej fermentacji. Wprowadził jako pierwszy pojęcie „gaz” i „węgla gaz” (dwutlenek węgla) [3]. Badania nad trawieniem i sokami trawiennymi kontynuował jego uczeń Franciscus Sylvius właśc. François Deleboe, (de la Boé) (1614–1672), natomiast odkrycie dwutlenku węgla przypisywane jest też Josephowi Blackowi (1728–1799), szkockiemu chemikowi. Wielki wkład w rozwój chemii klinicznej wniósł angielski fizyk, chemik, filozof i przyrodnik Robert Boyle (1629–1691). Użył terminu „analizy” aby opisać reakcje chemiczne, dzięki którym poszczególne substancje mogą być oddzielone od siebie i usystematyzował je. Wprowadził też definicję pierwiastka chemicznego, a także użył wskaźników w celu odróżnienia kwasów od zasad. Rozwinął chemiczną analizę jakościową i jako pierwszy opisał chemiczną analizę krwi [4]. W II połowie XVIII wieku drogę rozwoju chemii wytyczali Karl Wilhelm Scheele (1742–1786) – pierwszy zsyntetyzował glicerol, Joseph Priestley (1733–1804) odkrywca m.in. tlenu, amoniaku i tlenku węgla, Antoine Laurent Lavoisier (1743–1794) – wyjaśnił naturę procesu oddychania i koncepcję utleniania, oraz Justus von Liebig (1803–1873) – zapoczątkował ilościową analizę elementarną [5]. W XVII w. belgijski lekarz i chemik Johann Baptista van Helmont pierwszy raz wprowadził do badania moczu analizę wagową [6]. W roku 1694 Holender Dekker Federik Leiden zaobserwował, że mocz zawierający białko tworzy osady, gdy gotuje się go z dodatkiem kwasu octowego [7, 8]. Dzięki odkryciu Leidena badanie moczu stało się bardziej wartościowe i przydatne w diagnozowaniu chorób. Angielski lekarz Thomas Willis w 1674 r. odświeżył wiedzę starożytnych Greków, Chińczyków, Egipcjan czy Hindusów i wprowadził do ówczesnej diagnostyki test smaku moczu [9]. Test ten pozwalał odróżnić wielomocz towarzyszący cukrzycy od moczu prostej [8]. W 1776 r. Mattew Dobson udowodnił, że słodki smak moczu i surowicy krwi chorych na cukrzycę jest spowodowany obecnością cukru [9]. W 1789 r. Antoine François de Fourcroy odkrywa cholesterol. W XIX

wieku swój początek mają też pierwsze prace badawcze nad enzymami. W 1835 r. Theodor Ambrose Hubert Schwann doniósł o obecności pepsyny w soku żołądkowym, a dziesięć lat później Louis Mialhe odkrył amylazę w ślinie. W 1846 r. Claude Bernard demonstruje jak w soku trzustkowym trawiona jest skrobia. Trzydzieści lat później Wilhelm Friedrich Kühne po raz pierwszy izoluje trypsynę.

Bardzo intensywny rozwój chemii klinicznej w latach 30. XIX w. doprowadził do wyodrębnienia diagnostyki laboratoryjnej jako osobnej gałęzi nauki. W 1830 r. Gerardus Mulder dokonał pierwszej analizy pierwiastkowej białek, a trzy lata później reakcja biuretowa została opisana przez Ferdinanda Rosego. Rose do roztworu białka jajka dodał siarczanu miedzi(II) oraz wodorotlenku potasowego, co spowodowało powstanie fioletowego zabarwienia roztworu [10]. W roku 1857 opisał ją niezależnie polski fizjolog Gustaw Piotrowski stąd czasami nazywano ją reakcją Piotrowskiego [11]. W roku 1844 Johann Florian Heller opisał test wykrywający obecność albuminy w moczu [4]. Po dodaniu do moczu stężonego kwasu azotowego na granicy płynów powstaje biały pierścień, który świadczy o obecności albuminy w badanym materiale [12]. Test ten nazwano od nazwiska odkrywcy testem pierścieniowym Hellera.

W 1837 r. Theodor Ludwig Wilhelm von Bischoff posługując się analizami biochemicznymi ustalił, że we krwi obecny jest wolny tlen i wolny dwutlenek węgla. Natomiast fizyk berliński Heinrich Gustav Magnus za pomocą aparatu próżniowego Toricellego ekstrahował lotne składniki (gazy) krwi i wykazał we krwi tętniczej, a także żylny obecność tlenu, dwutlenku węgla i azotu. Naukowiec ten udowodnił, że we krwi tętniczej przeważa tlen a w żylny dwutlenek węgla [3].

W 1838 r. George Owen Rees wykazał obecność glukozy we krwi cukrzyków i wyizolował ją w postaci kryształów [13]. W 1841 r. Karl August Trommer opracował metodę wykrywania cukru w moczu. W metodzie tej cukry redukują kationy miedzi Cu^{2+} same utleniając się do kwasów aldonowych (np. glukoza utlenia się do kwasu glukonowego). Nie miała ona jednak tak szerokiego zastosowania jak jej modyfikacja, którą w 1849 r. rozpowszechnił niemiecki chemik Hermann Christian von Fehling [14, 15]. Przeprowadza się ją przy użyciu odczynnika Fehlinga tj. kationów miedzi(II) kompleksowanych anionami winianowymi. Pojawienie się czerwonego osadu tlenku miedzi(I) oznacza pozytywny wynik próby [5].

W 1844 r. Max Joseph von Pettenkofer pierwszy opisał proces wykrywania kwasów żółciowych [16]. Test nazywany od nazwiska odkrywcy polegał na reakcji kwasów żółciowych z hydroksymetylofurfurałem – powstającym w czasie działania stężonego kwasu siarkowego na sacharozę [17, 18]. Pojawienie się barwy czerwonej lub fioletowej świadczyło o obecności w próbce kwasów żółciowych [19, 20].

W 1847 r. lekarz i chemik Henry Bence Jones publikuje opis patologicznego białka w moczu, które jest obecne u niektórych pacjentów z chorobami układu kostnego (szpiczakiem mnogim) [4]. Metoda wykrywania tzw. lekkich łańcuchów immunoglobulin opracowana została przez kolegów Bence Jonesa – doktorów MacIntyre'a i Watsona. Zauważyli oni, że mocz jednego z pacjentów jest opalizujący

jący. Badając ten mocz zauważyli białkowy osad wytrącony po podgrzaniu do temp. 60°C. Po dalszym podgrzaniu osad rozpuścił się, a schłodzenie moczu do temp. 60°C spowodowało ponowne pojawienie się osadu. Ze względu na niemożność identyfikacji białka wspomniani powyżej lekarze wysłali próbkę moczu do dr Bence Jonesa, który zweryfikował oraz opublikował ich odkrycie, w końcu białko nazwano jego nazwiskiem [21].

W 1850 r. Carl Schmidt przeprowadził pierwszą analizę krwi, która pozwoliła ustalić zawartość składników organicznych i nieorganicznych [22]. Schmidt analizował krew pod kątem obecności potasu, sodu, fosforu i wapnia. Odkrył, że większe stężenie potasu znajduje wewnątrz komórki, natomiast sód w wyższym stężeniu obecny jest w osoczu [23]. W 1854 r. Hermann Welcker zapoczątkował badania nad oznaczaniem barwnika krwi [22]. Nazwanie barwnika krwi hemoglobina i oznaczania jej stężeń nastąpiło dopiero w latach 1864–65 dzięki pracy Felixa Hoppe-Seylera [24].

W 1868 r. Max Jaffè zauważył, że po dodaniu cynku mocz gorączkujących pacjentów wykazuje silną, zieloną fluorescencję [25]. Reagujący w ten sposób związek nazwano urobiliną. Jaffè stwierdził także, że jest ona obecna również w moczu pacjentów zdrowych, lecz w innym stężeniu. Spostrzeżenie to przyczyniło się do podjęcia próby określania granic prawidłowych dla niektórych składników fizjologicznych moczu [14]. W 1886 r. Jaffè opracował metodę szacowania stężenia kreatyniny z użyciem pikrynianu. W wyniku reakcji pikrynianów z kreatyniną w środowisku alkalicznym powstaje pochodna 2,4,6,-trinitro-cykloheksadienu o zabarwieniu żółto-czerwonym. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia kreatyniny [26].

W 1884 r. Paul Ehrlich opisał reakcję bilirubiny z kwasem *p*-diazobenzeno-sulfonowym i zastosował ją do wykrywania bilirubiny w moczu [27]. W 1913 r. A. A. Hymens van den Bergh i J. Snapper użyli tego testu do wykazania obecności bilirubiny w surowicy krwi [28]. Bilirubina z dwuazowym kwasem sulfanilowym (odczynnik dwuazowy Ehrlicha) tworzy barwną pochodną azobilirubinę. Intensywność czerwonego zabarwienia jest proporcjonalna do ilości bilirubiny w surowicy krwi. Trzy lata później van den Bergh i P. Muller odkryli dwie formy bilirubiny: bezpośrednią – reagującą od razu z odczynnikiem Ehrlicha oraz tzw. bilirubinę pośrednią, która reagowała z odczynnikiem Ehrlicha po dodaniu do próbki metanolu [29]. W 1901 r. Ehrlich wprowadził metodę z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem w obecności kwasu solnego, który daje zabarwienie czerwone w teście na obecność urobilinogenu w moczu. W 1925 r. Adrianus Johannes Leonardus Terwen opisał metodę oznaczania urobilinogenu w stolcu [30]. W 1933 r. Armand J. Quick zaproponował test z kwasem hipurowym, aby ocenić funkcjonowanie wątroby. Test oparty był na reakcji sprzęgania w wątrobie egzogenego benzoesu sodu z glicyną, w konsekwencji czego powstaje kwas hipurowy, który następnie wydalany jest z moczem [31].

Otto Knut Folin (1867–1934) szwedzki profesor biochemii opracował w latach 1904–1922 ilościowe metody analityczne dla mocznika, amoniaku, kreatyniny, kwasu moczowego, azotu, fosforu i chlorków. Folin zaproponował oznaczanie mocznika za pomocą chlorku magnezu a kwasu moczowego przez strącanie siarczanem amonu i mianowanie osadu rozpuszczając go kwasem [32]. Kreatynina w alkalicznym roztworze kwasu pikrynowego daje zabarwienie czerwone. Folin wprowadził do chemii klinicznej kolorymetrię, mierząc zabarwienia próbek kreatyniny z odczynnikiem Jaffego w odniesieniu do zabarwienia roztworów kreatyniny o znanym stężeniu przy użyciu kolorymetru Duboscq'a [33, 34]. Folin opracował też pierwsze wartości prawidłowe dla kwasu moczowego we krwi, azotu mocznikowego oraz białka w surowicy krwi [35]. Folin i Hsien Wu w 1919 r. opracowali metodę wykrywania cukru poprzez redukcję kwasu wolframowego w próbce pełnej krwi, którą następnie filtrowano [36]. W 1923 r. swoją metodę oznaczania cukru wprowadzili Hans Christian Hagedorn i Briger Norman Jensen. W metodzie tej cukier redukuje żelazicyjanek do żelazocyjanku a nadmiar żelazicyjanku oznacza się jodometrycznie miareczkując tiosiarczanem [37].

W 1906 r. Richard Bauer wprowadził test tolerancji galaktozy z podaniem jej doustnie. Wykazał, że jest ona obecna w moczu po około 5 godzinach od podania [38]. Mocz pobrany od pacjenta badano metodami jakościowymi Fehlinga, Benedicta i Nylander'a. Brak cukru w moczu świadczył o wyniku negatywnym całego testu, gdy zaś stwierdzano jego obecność wówczas należało go oznaczyć ilościowo przy użyciu polarymetru [39].

Metody oznaczania sodu i potasu opracowane przez Benjamina Kramera i Fredericka F. Tisdalla były bardzo czasochłonne i niedokładne. W przypadku potasu zasada metody polegała na wytrąceniu potasu z surowicy jako azotynokobaltanu sodowo-potasowego i miareczkowaniu osadu nadmanganianem. Natomiast sód wytrącano jako piroantymonian po czym oznaczano jodometrycznie antymon [33]. Przełomem okazało się stworzenie fotometru płomieniowego. Chlorki w płynach biologicznych określano ilościowo po dodaniu stężonego azotanu srebra, który wytrącał je z badanego płynu ustrojowego. W 1921 r. J.C. Whitehorn zastosował tę procedurę z użyciem kwasu wolframowego, a następnie filtrował krew pełną [40].

W celu określenia stężenia wapnia używano metody Kramera-Tisdalla, która następnie została zmodyfikowana przez E.P. Clarka i J.B. Collipa w 1925 r. [41]. Zasada metody polegała na wytrąceniu wapnia szczawianem amonowym. Wytrącony szczawian wapnia rozpuszczał się w kwasie siarkowym. Uwolniony przy tym kwas szczawiowy oznaczano manganometrycznie. Technikę tę kontynuowano i standaryzowano przez następne 40 lat [42]. W 1922 r. Willey Glover Denis opracowała pierwszą metodę laboratoryjną pozwalającą na oznaczenie magnezu w surowicy krwi, osoczu i krwi pełnej. Metoda polegała na usunięciu wapnia jako szczawianu, następnie wytrąceniu magnezu w postaci fosforanu amonowo-magnezowego. W powstałym osadzie oznaczano kwas fosforowy kolorymetrycznie i z niego obliczano zawartość magnezu [43]. W oznaczeniach fosforu nieorganicznego wykorzy-

stywano kwas molibdenowy. Postępem było wprowadzenie w 1921 r. przez Cyrusa H. Fiske i Yellapragda Subbarowa kwasu alfa- aminonaftolosulfonowego jako czynnika redukującego a powstające niebieskie zabarwienie porównywano kolorymetrycznie z zabarwieniem roztworów wzorcowych [44]. Metoda ta stosowana była w laboratoriach aż do początku XXI wieku.

W 1939 r. Edward Joseph Conway i Robert Cooke opracowali pierwszą metodę laboratoryjną oznaczania amoniaku we krwi. Zasada oznaczenia polegała na wyparciu amoniaku przez nasycony roztwór węglanu potasu i związanie go przez kwas borowy, a następnie miareczkowanie boranu amonowego kwasem siarkowym wobec wskaźnika Ma Zanzaga [45].

W 1902 r. Joseph Barcroft i John Scott Haldane wprowadzili pojęcie „gazometria” dla pomiaru gazów obecnych we krwi [46, 47]. Pierwsze satysfakcjonujące oznaczenie pH krwi nastąpiło w 1912 r. z użyciem elektrody wodorowej przez Karla Hasselbalcha i Christiana Lundsgaarda [48] oraz Leonora Michaelisa i W. Davidoffa [49]. Dziesięć lat później Glenn E. Cullen opisał kolorymetryczną metodę oznaczania pH w osoczu [50, 51]. Donald Dexter Van Slyke (1883–1971) użył jako pierwszy w 1917 r. gazometru własnej konstrukcji w celu określenia całkowitego dwutlenku węgla, tlenu i tlenku węgla we krwi pełnej [52]. Próbkę krwi zakwaszono a uwolniony dwutlenek węgla przedostawał się do komory, w której wytworzono próżnię. Później gaz sprężano do ciśnienia atmosferycznego i mierzono jego objętość [49].

Pierwsze metody określenia stężenia białka bazowały na procedurach Johana Kjeldahl'a. Do diagnostyki wprowadzili je w 1920 r. Glenn E. Cullen i Donald D. Van Slyke [53]. Związki organiczne spalano kwasem siarkowym(VI) w obecności katalizatora (jony miedzi). Uwolniony amoniak z powstałego siarczanu amonowego oznaczano przy pomocy miareczkowania [54].

Białko ostrej fazy (CRP) opisali po raz pierwszy w 1930 r. William Smith Tillett i Thomas Francis jr [55]. Przez ponad 50 lat CRP było oznaczane przede wszystkim dla potrzeb diagnostyki chorób reumatycznych przy użyciu metody immunodyfuzji radialnej, która była czasochłonna, wynik otrzymywano dopiero po 48 godzinach. W drugiej połowie lat 80-tych przy użyciu metod immunoturbidymetrycznych czas oczekiwania na wynik skrócił się do kilkunastu minut. Kolejnym etapem było zwiększenie czułości oznaczeń CRP (tzw. metody wysokiej czułości (ang. *high sensitivity*)) poprzez wykorzystanie cząstek lateksu opłaszczonych przeciwciałami [56].

W 1910 r. metodę oznaczania cholesterolu we krwi bazującą na reakcji Karla Theodora Liebermanna-H. Burcharda opisał A. Grigaut. Cholesterol w obecności kwasu siarkowego i bezwodnika kwasu octowego tworzy zielony kwas monosulfonowy bicholestadienu [57]. Natomiast bezpośrednią metodę chemicznego oznaczania triglicerydów opisał dopiero w 1957 r. Emile Van Handel i Donald Zilversmit. Po ekstrakcji lipidów i usunięciu fosfolipidów z ekstraktu, hydrolizuje się triglicerydy do gliceryny i wolnych kwasów tłuszczowych. Powstającą glicerynę oznacza się kolorymetrycznie. W metodzie do ekstrakcji wykorzystuje się chloroform a do absorpcji kwas krzemowy [58].

W 1930 r. Hubert Davenport Kay dał początek enzymologii klinicznej opracowując pierwszą metodę oceny aktywności fosfatazy alkalicznej. Jako substratu użył czystego krystalicznego β -glicerofosforanu sodu o pH 7,6 [59]. Dwa lata później I.S.Cherry i L.A. Crandall opracowali metody pomiaru aktywności lipazy w surowicy krwi. Najczęściej używanym substratem do oznaczania aktywności lipaz była oliwa z oliwek zawierająca trioleinian glicerolu. Zawiesinę oliwy inkubowano z próbką materiału biologicznego. Ilość uwolnionych kwasów tłuszczowych oznaczano przez miareczkowanie ługiem potasowym w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika [60].

W 1938 r. Michael Samogyi rozwinął metody oznaczania amylazy w surowicy i moczu. Zasada metody oparta jest na określeniu czasu potrzebnego do rozkładu skrobi z zaadsorbowanym na powierzchni jodem (niebieska barwa roztworu) przez obecną w badanym materiale biologicznym diastazę (amylazę) do niskocząsteczkowych dekstryn (roztwór bezbarwny) [61]. W tym samym roku Alexander B. Gutman i Ethel B. Gutman opracowali pierwszy test pozwalający określić aktywność fosfatazy kwaśnej w surowicy krwi. Jako substratu użyli fenylofosforanu [62]. Do 1948 r. w laboratoriach medycznych rutynowo oznaczano tylko cztery enzymy: amylazę i lipazę w diagnostyce ostrego zapalenia trzustki, fosfatazę kwaśną służącą jako wskaźnik przy diagnozowaniu raka prostaty oraz fosfatazę alkaliczną wykorzystywaną w diagnostyce żółtaczek lub zmian w układzie kostnym [63]. Intensywny rozwój enzymologii klinicznej przypadł na połowę XX w. W 1954 r. Stephen A. Kuby i współpracownicy opracowali metodę oznaczania kinazy fosfokreatynowej (CPK) [64]. W roku 1955 Arthur Karmen wprowadził metodę oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST), a Felix Wróblewski i John S. LaDue wprowadzili metodę oznaczania aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT). AST katalizuje reakcję L-asparagianu i α -ketoglutaranu, w wyniku której powstaje szczawiooctan i L-glutaminian. Natomiast ALT katalizuje przeniesienie grupy aminowej od L-alaniny do α -ketoglutaranu z utworzeniem L-glutaminianu i pirogronianu [65]. Metody te, po modyfikacjach, dalej zalecane są przez IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). W tym samym roku Wróblewski i LaDue wprowadzili metodę oznaczania dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która również jest dalej zalecana przez IFCC. Dehydrogenaza mleczanowa katalizuje konwersję pirogronianu do mleczanu. Jednocześnie cząsteczka NADH utlenia się do cząsteczki NAD⁺. W roku 1960 oznaczono także aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) [66]. GGT katalizuje przeniesienie grupy γ -glutamylowej z L- γ -glutamilo-3-karboksy-4-nitroanilidu na glicyloglicynę, w wyniku czego powstaje L- γ -glutamylglicyloglicyna i żółto zabarwiony 5-amino-4-nitrobenzoesan. Szybkość przyrostu absorbancji mierzona przy długości fali 405 nm jest proporcjonalna do aktywności GGT. Metoda ta też jest obecnie powszechnie wykorzystywana.

Początki endokrynologii laboratoryjnej to przełom XIX i XX w. – w latach 1898–1902 John Jacob Abel i Jokichi Takamine wyizolowali po raz pierwszy aktywną epinefrynę (adrenalinę). Pierwszą metodę jej oznaczania (fluorymetryczną) zapro-

ponował Alf Lund w 1949 r. [67, 68]. W 1938 r. Frank Herbert Shaw wyizolował przy użyciu tlenku glinu katecholaminy z materiału biologicznego i opisał występowanie tych substancji we krwi i moczu ludzkim. W 1938 r. Nancy Helen Callow i Robert Kenneth Callow opisali występowanie 17-ketosterydów w moczu [69], a dwa lata później tym samym problemem zajęli się A.F. Holtroff i F.C. Koch. Naukowcy wykozystali w tym celu reakcję Zimmermana, który 1935 roku zauważył, że 17-ketosterydy z *m*-dinitrobenzenem w zasadowym roztworze alkoholu zabarwiają się na kolor czerwony [70]. 17-hydroksykortykosterydy nie były oznaczane w laboratoriach aż do 1950 r., kiedy to Curt C. Porter i Robert H. Silber opisali reakcję kolorymetryczną z fenylohydrazyną [71]. W 1919 r. Edward Calvin Kendall jako pierwszy wyizolował tyroksynę, a jej budowę chemiczną odkrył Charles Robert Harington w 1926 r. [72]. W 1937 r. Ernest Birger Sandell i Izaak Maurits Kolthoff przedstawili czułą metodę pomiaru jodu [73], a w 1939 r. Virginia Trevorrow zademonstrowała, że jod we krwi występuje w dwóch formach: organicznej i nieorganicznej [74]. Druga połowa XX w. to szybki rozwój diagnostyki hormonalnej jednak związany z postęпами w immunologii i immunochemii.

Podobna sytuacja ma miejsce w toksykologii. Pierwsze metody ilościowego oznaczania alkoholu we krwi pojawiły się na początku dwudziestego stulecia, ale dopiero metoda Erika Widmarka, opublikowana w 1920 roku, upowszechniła się na całym świecie i była stosowana w laboratoriach do końca lat 90. XX w. [75]. Zawarty we krwi alkohol, w warunkach izotermicznych w szczelnie zamkniętej kolbie Widmarka ulega oddestylowaniu do mianowanego roztworu dichromianu potasu w stężonym kwasie siarkowym(VI). Mieszanina chromowa utlenia alkohol do kwasu octowego. Nieprzereagowaną chromiankę miareczkuje się tioglikolem sodu [55]. Obecnie większość toksycznych związków oznaczana jest metodami immunochemicznymi lub przy pomocy chromatografii i spektrometrii mas.

Początkowo objętości krwi lub surowicy jakich używano do wykonania pojedynczego oznaczenia były ogromne. W latach 40. XIX w. na oznaczenie albuminy potrzebowano 180 ml krwi, glukozy 360 ml, kwasu moczowego 65 ml [30]. Na przełomie XIX i XX w. używanie próbki mniejszej niż 1 ml do badań rutynowych w chemii klinicznej było ewenementem. Oznaczenie kwasu moczowego wymagało pobrania 15–25 ml krwi, mocznik oznaczano z próbki o objętości 10 ml, ale satysfakcjonujące wyniki można było uzyskać już z objętości 3 ml [10]. Na oznaczenie jonów sodowych i potasowych zużywano po 5 ml surowicy na każdy [30], oraz w późniejszych latach po 2 ml na oznaczenie jonów wapniowych i magnezowych [33]. Jednak szybko zauważono konieczność stosowania metod, które wykorzystywałyby mniejszą objętość krwi. Wiązało się to też ze stale rozszerzającym panelem dostępnych badań, co powodowało pobieranie większych objętości materiału przy ograniczonej dostępności materiału biologicznego u dzieci i małych zwierząt doświadczalnych. Ponadto konieczność częstego pobierania krwi nawet u dorosłych mogła doprowadzić do anemii. Jednym z prekursorów opracowywania mikrometod był Ivar Christian Bang (1869–1918), który wprowadził do diagnostyki laboratoryj-

nej pierwsze mikrometody oznaczania glukozy, azotu pozabiałkowego, mocznika, oraz separowania albumin i globulin, które wymagały pobrania tylko 0,1–0,2 ml krwi na jedno oznaczenie. Jednak zmniejszenie objętości próbek w rutynowych w oznaczeniach laboratoryjnych do 0,1–1,0 ml krwi na oznaczenie jednego parametru wymagało nie tylko specjalnych technik, ale i aparatów, które wprowadzono powszechnie dopiero w latach 50. XX w. [10].

Przed wprowadzeniem do rutynowych oznaczeń metod kolorymetrycznych bardzo często bazowano na ocenie wizualnej koloru badanej próbki przez porównywanie go z zabarwieniem standardów o znanym stężeniu. Sposoby te były bardzo niedokładne i subiektywne – w dużej mierze zależały od indywidualnych predyspozycji. Na początku XX w. intensywnie rozwijano metody kolorymetryczne, które pozwoliły na obiektywne, powtarzalne, a także szybkie i stosunkowo łatwe oznaczanie coraz większej liczby składników krwi i innych płynów ustrojowych [52]. Pierwszy kolorymetr został opracowany w 1854 r. przez Julesa Duboscq'a. Tego typu instrumenty były produkowane jeszcze w latach dwudziestych XX w. Celem oznaczeń kolorymetrycznych było zrównanie barwy badanego roztworu z barwą roztworu wzorcowego. W kolorymetrze Duboscq'a realizowano to założenie poprzez zmianę grubości warstwy roztworu badanego. Do jednej próbki (cylindra) wlewano roztwór wzorca o znanym stężeniu, do drugiej roztwór badany. W obu próbkach zanurzano szklane walce. Głębsze zanurzenie walca lub podniesienie próbki, zmniejszało grubość warstwy między dnem próbki a końcem walca, a tym samym grubość warstwy roztworu przez jaką przechodziło kierowane od góry na walce światło. Zabarczenie próbek obserwowano na odpowiednio umieszczonym lusterku pod próbkami. Ze znanego stężenia roztworu wzorcowego i stosunku grubości warstw roztworów, można było wyliczyć stężenie nieznanego roztworu. Istniały też kolorymetry klinowe, w których zmiana grubości warstwy cieczy zmieniana była przez wsuwanie klina (kolorymetry Helliga) oraz kolorymetry w których doprowadzano do zrównania barwy roztworów poprzez rozcieńczenie próbki badanej (hemoglobinometr Sahliego). Kolorymetry fotometryczne wprowadzono do użytku w latach trzydziestych XX wieku. W 1939 r. William H. Summerson stworzył urządzenie z podwójnymi fotokomórkami i kuwetami typu „test-tube”, punktem zerowym i skalą absorbancji od 0 do 1.00. Aparat nazwano Klett-Summerson. W 1940 r. został wykorzystany do oznaczeń po raz pierwszy spektrofotometr zbudowany przez Edwina D. Colemana, a rok później Henry „Howard” Cary i Arnold O. Beckman zbudowali spektrofotometr Beckman DU. Model ten znalazł szerokie zastosowanie w badaniach biochemicznych [49]. Aż do czasów obecnych pomiary kolorymetryczne są standardem w analizach chemii klinicznej. Wraz z rozwojem elektrotechniki a następnie komputeryzacją następowały kolejne etapy rozwoju laboratoryjnego instrumentarium – w 1957 roku wprowadzono do użytku pierwszy zautomatyzowany spektrofotometr (Autoanalyzer firmy Technicon), a w 1970 roku Automatic Clinical Analyzer f. Du Pont zapoczątkowując nową erę w diagnostyce laboratoryjnej – wykonywanie oznaczeń w dowolnych konfiguracjach, a nie jak do

tej pory w seriach [76]. Duża wydajność kolejnych generacji automatów spowodowała zanik małych pracowni i rozwój dużych laboratoriów, z reguły daleko od pacjenta. Odpowiedzią na kliniczną potrzebę skrócenia czasu oczekiwania na wynik jest rozwój diagnostyki wykonywanej przy pacjencie przez lekarzy lub pielęgniarki. W ten sposób historia zatacza koło, choć obecnie samodzielnie wykonywana diagnostyka *in vitro* wydaje się być dla lekarzy złem koniecznym.

Ogromny wzrost liczby parametrów wykonywanych w laboratoriach diagnostycznych w ostatnich latach nie wynika z rozwoju metod chemicznych. Raczej jest efektem wprowadzania pod koniec XX wieku do diagnostyki laboratoryjnej metod fizykochemicznych – jak wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna, spektrometria masowa, oraz immunochemicznych bazujących na reakcjach antygen przeciwciała. Nowe możliwości diagnostyczne pozwalają na ocenę funkcjonowania organizmu w szerszym kontekście, w ramach tzw. biologii systemowej – proteomiki czy metabolomiki. Karty tej historii dopiero się otwierają.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Stewart, *Clin. Chem.*, 1964, **10**, 268.
- [2] M. Michalik, *Kronika medycyny. Kronika*, Warszawa 1994.
- [3] H. Pankiewicz, *Farm. Pol.*, 1971, **2**, 1005.
- [4] S. Winsten, *Clin. Chem.*, 1969, **15**, 740.
- [5] J. Fruton, S. Simmonds, *Biochemia ogólna*, PZWL Warszawa 1966.
- [6] D. Berger, *MLO Med. Lab. Obs.*, 1999, **7**, 28.
- [7] W. White, *Clin Chem.*, 1991, **37**, 121.
- [8] J. Bolodeoku, D. Donaldson, *J. Clin. Path.*, 1996, **49**, 624.
- [9] E. Dukan, I. Milne, *J. R. Physicians Edinb.*, 2011, **41**, 376.
- [10] L. Rosenfeld, *Four Centuries of Clinical Chemistry*, Taylor & Francis, New York 1999.
- [11] F. Rose. *Annalen der Physik und Chemie*, 1833, doi:10.1002/ andp.18331040512.
- [12] E. Kaiser, *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 1994, **32**, 579.
- [13] N. Coley. *Med. His.*, 1986, **30**, 214.
- [14] T. Brzeziński, *Historia medycyny*, PZWL, Warszawa 2000.
- [15] P. Davies, *J. R. S. Med.*, 1993, **86**, 161.
- [16] W. Griffiths, J. Sjövall, *J. Lipid Res.*, 2010, **51**, 23.
- [17] I. MacIntyre, I. Wootton, *Clin. Biochem. Ann. Rev. Biochem.*, 1960, **29**, 635.
- [18] M. Cieszyńska, *Medyk Białostocki*, 2010, **89-92**, 26.
- [19] N. Mani *J. Clin.Chem. Clin. Biochem.*, 1981, **19**, 316.
- [20] M. Aldrich, M. Bledsoe, *J. Biol. Chem.*, 1927, **77**, 519.
- [21] J. Abadie, *LabMedicine*, 2009, **40**, 181.
- [22] B. Urbanek, *Kwartalnik Historii Nauki i Techniki*, 2009, **54**, 102.
- [23] C. McCay, *J. Nutr.*, 1953, **49**, 3.
- [24] L. Hazelwood, *Can't Live Without It. The Story of Hemoglobin in Sickness and in Health*, Nova Science Publishers, Inc., Nowy Jork 2001.
- [25] P. Lowry, N. Ziegler, C. Watson, *Bulletin of the University of Minnesota Hospitals and Minnesota Medical Foundation*, 1952, **24**, 166.
- [26] M. Jaffe, *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1886, **10**, 391.

- [27] P. Ehrlich, Z. Klin. Med. (Journal of Clinical Medicine), 1882–1883, 5, 1.
- [28] C. Watson. Ann. Intern. Med., 1956, 45, 351.
- [29] P. Bosma. J. Hepatol., 2003 38, 107.
- [30] W. Caraway. Clin. Chem., 1973, 19, 380.
- [31] A. Quick. Am. J. Med. Sci., 1933. 185, 630.
- [32] W. Moraczewski, Chemik Polski, 1902, 25, 583.
- [33] B. Charłampowicz-Laszczkowa, *Mikrochemiczne analizy lekarskie krwi i moczu*, Księgarnia Stefana Kamińskiego, Kraków, 1949.
- [34] O. Folin, J. Morris, J. Biol. Chem., 1914, 17, 469.
- [35] L. Rosenfeld, Bull. Hist. Chem., 1999, 24, 42.
- [36] L. Winter, W. Smith. Br. Med. J., 1923, 32, 894.
- [37] M. Tulczyński, *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej*, PZWL, Warszawa 1962.
- [38] H. Colcher, A. Patek, F. Kendall, J. Clin. Invest. 1946, 25, 768.
- [39] F. Loewy, JAMA, 1931, 96, 459.
- [40] J. Short, A. Gellis, J. Biol. Chem., 1927, 73, 219.
- [41] I. MacIntyre, Biochem. J., 1957, 67, 164.
- [42] S. Meiters, Clin. Chem., 2000, 46, 1011.
- [43] S. Meiters, Clin. Chem., 1985, 31, 777.
- [44] C. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
- [45] E. Conway, R. Cooke, Biochem. J., 1939, 33, 457.
- [46] F. Roughton, J. Kendrew, *Haemoglobin- A symposium based on a Conference held at Cambridge in June 1948 in memory of Sir Joseph Barcroft*, London Butterworths Scientific Publication, New York Interscience Publishers INC, 1949.
- [47] F. Dickens, G. Greville. Biochem. J., 1933, 27, 213
- [48] J. Severinghaus, P. Astrup, J. Murray, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1998, 157, 117
- [49] W. Caraway, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1981, 19, 494
- [50] J. Severinghaus, P. Astrup, J. Clin Monitor., 1985; 1, 260
- [51] M. Lisse, O. Jensen, R. Tittsler, J. Bacteriol., 1931 21, 384
- [52] L. Rosenfeld, Clin. Chem., 2000, 48, 193,
- [53] L. Rosenfeld, *Origins of Clinical Chemistry: The Evolution of Protein Analysis*, Academic Press, New York 1982
- [54] F. Kokot, *Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice*, PZWL Warszawa 1969.
- [55] L. Sherwood, *William Smith Tillett 1892–1974*, National Academy of Sciences, Washington D.C. 1993.
- [56] D. Bobilewicz, Przegl. Med. Lab., 2011, 1, 12.
- [57] N. Rifai, G. Cooper, W. Brown, W. Friedewald, R. Havel, G. Myers, G. Warnick, Clin. Chem., 2004, 50, 1861.
- [58] J. McNamara, G. Warnick, G. Cooper, Clin. Chim Acta, 2006; 369, 160.
- [59] H. Kay, J. Biol. Chem., 1930, 89, 235.
- [60] L. Crandall, I. Cherry, Arch. Neurol. Psych., 1932, 27, 367.
- [61] M. Samogyi, Arch. Intern. Med., 1941, 67, 665.
- [62] A. Gutman, E. Gutman, J. Robinson. Am. J. Cancer, 1940, 38, 103.
- [63] L. Rosenfeld, Clin. Chem., 2000, 46, 1712.
- [64] A. Teixeira, G. Borges, Braz. J. Biomotricity, 2012, 6, 53.
- [65] A. Karmen, F. Wróblewski, J. LaDue, J. Clin. Invest., 1955, 34, 126.
- [66] J. Goldbarg, O. Frideman, E. Pineda, Arch Biochem Biophys., 1960, 91, 61
- [67] A. Lund, Acta Pharmacol. Toxicol., 1949, 5, 121
- [68] J. Parascandola, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125, 515

- [69] N. Callow, R. Callow, *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1759
- [70] A. Holtorff, F. Koch, *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 377
- [71] T. Maeda, H. Matsuzaki, T. Sekine, *Clin. Chem.*, 1988, **34**, 1392
- [72] C. Harington, *Biochem. J.*, 1926, **20**, 293
- [73] E. Sandell, I. Kolthoff, *Microchim. Acta*, 1937, **1**, 9
- [74] V. Trevorrow, *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 737
- [75] T. Konopka, *Archiwum Medycyny Sądowo-Kryminologicznej*, 2010, **60**, 164
- [76] M. Bishop, E. Fody, L. Schoeff, *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia 2013.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 stycznia 2016