

**INTERNÍ HEMATOLOGICKÁ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA**

tel: 532 234 111, fax: 543 223 428

IČO: 652 697 05, DIČ: CZ65269705

Nositel certifikátu ISO 9001:2000

www.fnbrno.cz

**FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO**

PRACOVIŠTĚ MEDICÍNY DOSPĚLÉH VĚKU

Jihlavská 20, 625 00 Brno

tel: 532 234 111, fax: 543 223 428



V Brně dne 21. 8. 2016

Věc: **Vyjádření k analýze Erytropoetinu ze vzorku moči Vojtěcha Sommera**

Vážená komise,

prostudovala jsem laboratorní dokumentaci týkající se analýzy vzorku moči Vojtěcha Sommera. Vzhledem k tomu, že mám dlouholeté praktické zkušenosti s prováděním analýz proteinů pomocí mnoha různých laboratorních technik (polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE), izoelektrická fokusace (IEF), dvourozměrná elektroforéza 2D SDS-PAGE, western-blotting (imunoblotting), detekce post-translačních modifikací proteinů pomocí proteomických přístupů včetně hmotnostní spektrometrie…), ráda bych se vyjádřila k získaným výsledkům provedené analýzy a jejich interpretaci.

V laboratoři IDAS v Drážďanech byla provedena analýza vzorků pomocí metody SAR-PAGE s cílem rozlišit přítomnost endogenního (fyziologického) erytropoetinu a případného erytropoetinu exogenního. Oba typy erytropoetinu se liší pouze post-translačními modifikacemi, převážně glykosylacemi, a proto může být rozlišení obou forem proteinu velmi obtížné. Tato metoda je dle dokumentu WADA TD2014EPO použitelná, nicméně uvedený dokument se pro účely detekce rekombinantního erytropoetinu odkazuje taktéž na metodiku izoelektrické fokusace, která by ve dvourozměrném nastavení s PAGE (2D IEF-PAGE) mohla přinést mnohem přesnější a prokazatelnější výsledky. Také většina publikovaných prací využívá spíše techniku izoelektrické fokusace (např. Breidbach, Clinical Chemistry, 2003).

V tomto případě však laboratoř použila pouze jednorozměrnou elektroforézu s následnou detekcí erytropoetinu pomocí protilátky. Endogenní EPO by se od exogenního (rekombinantního) měl lišit pouze šířkou elektroforetického pruhu (tzv. čmouhou, angl. smear) – viz obr. 4 v dokumentu WADA TD2014EPO. Ve výsledkové dokumentaci V. Sommera se však nevyskytuje podobný široký elektroforetický pruh se „čmouhou“, který by naznačoval přítomnost rekombinantního EPO (elektroforetické vzorky v bězích 5, 8, 16, 19 vykazují vysokou podobnost s negativními kontrolami v bězích 3, 7, 14, 20). Proto se na základě svých zkušeností s využitím těchto technik domnívám, že z provedené analýzy nelze učinit prokazatelný závěr o přítomnosti exogenního erytropoetinu ve vzorku moči Vojtěcha Sommera. Navíc již byly v literatuře popsány případy falešné pozitivity stanovení rekombinantního erytropoetinu v moči (tyto výsledky byly publikovány M. Beullens s kolektivem s nejvýznamnějším hematologickém časopise Blood).

Pro vyjasnění přítomnosti resp. nepřítomnosti exogenního EPO by bylo třeba vzorky analyzovat dalšími metodami, které jsou schopny s vyšší přesností detekovat post-translační modifikace proteinu, např. 2D SDS-PAGE nebo hmotnostní spektrometrie. Také je nutno zvážit fyziologickou hladinu erytropoetinu v krvi a stanovit případné genetické abnormality v genu pro erytropoetin, které by mohly mít za následek odlišnou expresi proteinu či úroveň jeho post-translačních modifikací. Bez znalosti výsledku těchto analýz a zvážení vlivu vnějších faktorů na expresi EPO (např. pobyt v prostředí s nižší hladinou kyslíku) rozhodně nelze učinit jednoznačný závěr o přítomnosti exogenního erytropoetinu v organizmu jmenovaného.

S pozdravem



Prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.

Centrum molekulární biologie a genové terapie

Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno

Černopolní 9, 613 00 Brno, CZ

E-mail: pospisilova.sarka@fnbrno.cz