Srinagarind Med J 1995; 10(3) 93-98

การเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินให้บริสุทธิ์ จากปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจาง

ประสงค์ คุณานุวัฒน์ชัยเดช *

ไมตรี สุทธิจิตต์ **

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น (40002).

** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ (50200).

Partial Purification of Urinary Erythropoietin from Anemic Patients

Prasong Koonanuwatchaidet *

Maitree Suttajit **

* Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Knon Kaen University, Khon Kaen, Thailand (40002).

** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand (50200).

ABSTRACT

Urinary erythropoietin from the anemic patients of Chiang Mai Hospital, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand was prepared and partially purified using various types of column chromatographic techniques; DEAE-Cellulose, Hydroxyapatite, Sephadex G-25 and Sephadex G-100 Columns. From this investigation, it was found that the actual yield obtained from 30 litres of original urine volume was 65 milligrams, the erythropoietic activity was 686.80 Cobalt Units per milligram and the purification factor was 6,733 times comparing with the Crude Urinary Powder.

Key Words : Erythropoietin, anemic patients, column chromatography, erythropoietic activity, purification factor.

บทคัดย่อ

การเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินให้บริสุทธิ์ ซึ่งใช้ปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางเป็นแหล่งของฮอร์โมนนั้น ได้กระทำโดยอาศัยวิธีการของเทคนิคโครมาโตกราฟี่ชนิดหลอดแก้ว ได้แก่ DEAE-cellulose column, Hydroxyapatite-Diatomite column, Sephadex G-25 และ Sephadex G-100 column เป็นต้น ฮอร์โมนที่เตรียมได้และทำให้บริสุทธิ์จนถึงขั้นตอนสุดท้าย โดยเริ่มต้นจากปัสสาวะของคนไข้ ปริมาตร 30 ลิตร มีปริมาณเท่ากับ 65 มิลลิกรัม มีความสามารถของฮอร์โมนเท่ากับ 686.80 Cobalt Units ต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์เป็น 6,733 เท่าของ Crude Urinary Powder.

คำรหัส : อีริทโธรปอยอีติน, คนไข้โรคโลหิตจาง, โครมาโตกราฟี่ชนิดหลอดแก้ว, ความสามารถของอีริทโธรปอยอีติน, ค่าความบริสุทธิ์

บทนำ

อีริทโธรปอยอีติน หรือ erythropoiesis stimulating factor (ESF) เป็นฮอร์โมนที่มีธรรมชาติทางเคมีเป็นกลัยโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000-60,000 ดาลตัน โดยผลิตและหลั่งออกมาจากไต[1,2,3] ฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการการสร้างเม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหน้าที่ที่เกี่ยวกับ erythroblast proliferation และ erythrocyte release[3,4] รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย[5] พบว่าฮอร์โมนชนิดนี้จะสร้างขึ้นมามากในคนไข้โรคโลหิตจางและโรคขาดสารอาหารที่สัมพันธ์กับภาวะของโลหิตจาง[6,7] ทั้งนี้เนื่องมาจากร่างกายของคนไข้ที่มีภาวะโลหิตจางนานาชนิดจะผลิตและหลั่งอีริทโธรปอยอีตินออกมาในพลาสมาและปัสสาวะสูงมากกว่าคนปกติหลายเท่าตัวโดยอาศัยกลไกของการชดเชย (compensation mechanism)[7,8,9,10,11] ซึ่งถือว่าเป็นระบบของการควบคุมของร่างกายที่ดีประการหนึ่ง ดังนั้นคณะผู้ทำวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการแยกและเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีติน รวมทั้งทำให้ฮอร์โมนชนิดนี้บริสุทธิ์ โดยอาศัยปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางชนิด aplastic[7,9] เป็นแหล่งของฮอร์โมนและอาจนำไปสู่การผลิตฮอร์โมนชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

วัสดุและการทดลอง

I. วัสดุเคมีภัณฑ์

DEAE-Cellulose ion-exchanger ซื้อมาจากบริษัท Carl Schelicher N.H. ประเทศสหรัฐอเมริกา Sephadex G-25 และ G-100 ซื้อมาจากบริษัท Pharmacia Uppsala ประเทศสวีเดน Sodium chloride และ cobalt chloride ได้มาจากบริษัท Fisher Scientific จำกัด Fairlawn, N.J. ประเทศสหรัฐอเมริกาและบริษัท May and Baker จำกัด London ประเทศสหราชอาณาจักร ตามลำดับ ส่วนสารกัมมันตรังสี (Fe-59) ในรูปของ isotopic ferric citrate นั้น ซื้อมาจากบริษัท Radiochemical Center, Amersham จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

II. วิธีการเก็บปัสสาวะจากคนไข้

ปัสสาวะชนิด 24-hour ของคนไข้โรคโลหิตจางชนิด aplastic จำนวน 8 ราย ที่เพิ่งเข้ารับรักษาใน 3 วันแรก ณ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้เก็บไว้เพื่อการแยกและเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินให้บริสุทธิ์ ตลอดการทดลองนี้คนไข้ทั้ง 8 รายนี้ได้รับการเจาะเลือดและตรวจหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และระดับของฮีมาโตคริตแล้ว พบว่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมีค่าต่ำกว่า 10 g% และระดับของฮีมาโตคริตมีค่าอยู่ระหว่าง 20-25 Volume% แบ่งเอาปริมาตรของปัสสาวะที่เก็บได้ทั้งหมดมาเพียง 30 ลิตร เพื่อใช้ในการทดลองเรียกว่า "Pooled Urine" ตัวอย่างปัสสาวะแต่ละครั้งที่เก็บได้จากคนไข้จะเติม toluene 2-3 หยด ลงไป เพื่อทำหน้าที่เป็นสารกันบูด

III. วิธีการเตรียม Crude Urinary Powder (CUP)

นำเอา "Pooled Urine" ปริมาตรรวม 30 ลิตร มาผ่านกระบวนการ dialysis ในห้องเย็นภายใต้น้ำกลั่นชนิด deionized เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุก 6 ชั่วโมง แล้ว lyophilized จนสมบูรณ์ นำเอา lyophilized material ที่ได้นี้ไปละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ปรับภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยค่อย ๆ หยดกรดเกลือลงไปเขย่าอย่างแรงสักครู่หนึ่งแล้วเอาไปปั่นแยก เพื่อแยกเอาสารอื่น ๆ ออกไปโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง Sorvall RC-2 ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาส่วนใสไปเขย่ากับ 4 เท่าโดยปริมาตรของ acetone ที่ทำให้เย็นแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ

4 เซลเซียส 1 คืน เรียกส่วนนี้ว่า acetone cake ในวันรุ่งขึ้นนำเอา acetone cake นี้ไปละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แยกเอาส่วนเป็นตะกอนออกอีกครั้ง โดยการปั่นแยกด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที นำเอาส่วนใสไปทำ dialysis และ lyophilized จนสมบูรณ์ จะได้ส่วนที่เป็นผงแห้งของตัวอย่างปัสสาวะ เรียกว่า "Crude Urinary Powder" (CUP) เพื่อจะนำเอาไปทำให้บริสุทธิ์ และตรวจวัดหาความสามารถของฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินต่อไป

IV. วิธีการเตรียมอีริทโธรปอยอีตินจาก CUP ให้บริสุทธิ์

นำเอา CUP ที่ได้ข้างต้นมาชั่ง 0.5 กรัม แล้วละลายน้ำกลั่นชนิด deionized ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายอย่างทั่วถึงแล้วนำเอาไปผ่าน DEAE cellulose column ขนาด 25x2.5 เซ็นติเมตร elute ด้วย 0.85% สารละลาย sodium chloride เก็บ fractions ที่ได้ fraction ละ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดหาปริมาณของโปรตีนโดยวัดความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และแบ่งออกไปตรวจสอบหาปริมาณของคาร์โบฮัยเดรท และกรดไซอาลิคที่อยู่ในรูปของ N-acetylneuraminic Acid (NANA) โดยวิธีของ Winzler และ Aminoff[12] นอกจากนี้ยังนำเอาไปวัดหาความสามารถของฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีติน โดยการวัดเปอร์เซ็นต์ของ Fe-59 incorporation ในเม็ดเลือดแดงของหนูขาว[6] สำหรับ CUP ที่เหลือทั้งหมดนำมาแยกและเตรียมฮอร์โมนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคของ column chromatography ตามลำดับขั้นตอน โดยวิธีของ Fisher และคณะ[13] ดังต่อไปนี้ :

ขั้นตอนที่ 1 นำเอา CUP มาละลายด้วยน้ำกลั่นชนิด deionized ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างทั่วถึงแล้วค่อยผ่านลงบน DEAE-cellulose column ขนาด 40 x 3.5 เซ็นติเมตร ซึ่ง equilibrated ด้วย 0.0375 M NaCl-0.025 M NaH_2PO4 buffer, pH 4.5 แล้ว elute ด้วย 0.17 M NaCl solution เก็บ fractions ต่าง ๆ ที่ออกมา fraction ละ 10 มิลลิลิตร โดยอาศัย automatic fraction collector (Fractomette, Model 3-200) ควบคุมอัตราของการไหลประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อนาที เลือกเอาเฉพาะ fractions ที่มีโปรตีนสูงเท่านั้น โดยวัดค่าความสามารถของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ตั้งแต่ 0.2 เป็นต้นไป เรียกว่า active fractions นำเอา fractions เหล่านี้มาทำ dialysis ในห้องเย็นภายใต้น้ำกลั่นชนิด deionized นาน 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุก 6 ชั่วโมงแล้วทำ lyophization ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 นำเอา lyophilized material จากขั้นตอนที่ 1 มาผ่าน column ของ hydroxyapatite-diatomite (1:1 v/v) ขนาด 15x2.0 เซนติเมตร elute ด้วย 0.001M Phosphate buffer, pH 6.8 เก็บ fractions ไว้ แล้วเลือกเอาเฉพาะ active fractions, มาผ่านขบวนการ dialysis และ lyophilization เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 3 นำเอา lyophilized material ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 มาผ่าน sephadex G-25 column ขนาด 25x2.5 เซ็นติเมตร elute ด้วย Phosphate buffer, pH 6.8 เก็บ fractions ที่ได้ แล้วเลือกเอาเฉพาะ active fractions ดังขั้นตอนที่ 1 และ 2 มาผ่านขบวนการ dialysis และ lyophilization ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 4 นำเอา lyophilized material ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 มาผ่าน DEAE-cellulose column อีกครั้งหนึ่งซึ่งใช้ขนาดของ column เป็น 20x2.5 เซ็นติเมตร elute ด้วย 0.02 M NaCl solution เก็บ fractions ไว้ แล้วเลือกเอาเฉพาะ active fractions เหล่านั้นมาทำ dialysis และ lyophilization ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 5 และ 6 ทั้งสองขั้นตอนสุดท้ายนี้เป็นการนำเอา lyophilization material ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 มาผ่าน sephadex G-100 column อีก 2 ครั้งด้วยกัน รวบรวมเอา active fractions มาผ่านขบวนการ dialysis และ lyophilization ผลิตผลสุดท้ายในขั้นตอนนี้เรียกว่า "Partially Purified Erythropoietin" ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความบริสุทธิ์สูงพอสมควร ในแต่ละขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นนี้ คณะผู้วิจัยได้นำเอา lyophilized material ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ yield และแบ่งเอาไปตรวจวัดหาความสามารถเฉพาะ (specific activity) ของฮอร์โมนด้วย

วิธีการวัดความสามารถของฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีติน

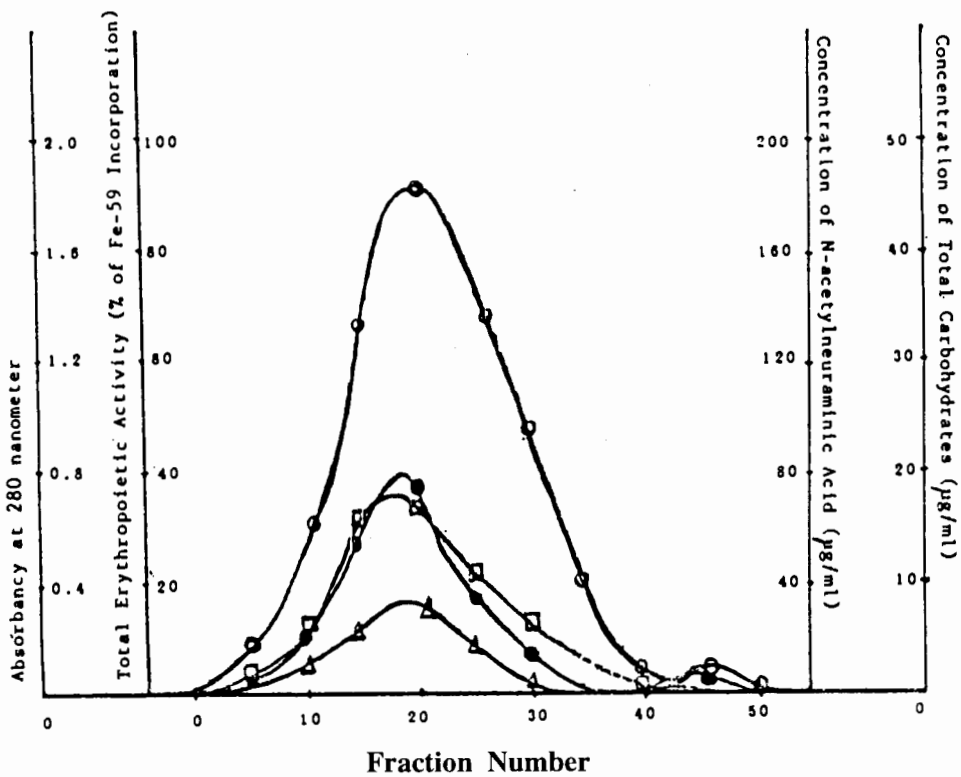
ฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินที่แยกและเตรียมให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน ได้นำเอามาตรวจวัดความสามารถเฉพาะโดยอาศัยวิธีของ Alippi[14] และของ Koonanuwatchaidet[6] ซึ่งมีหน่วยเป็น Cobalt Unit ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

จากการทดลองนี้พบว่า 1 Cobalt Unit มีความเฉลี่ยเท่ากับ 7.76 % ของ Fe-59 incorporation ในเม็ดเลือดแดงของหนูขาวที่อดอาหารอย่างสมบูรณ์ โดยใช้เครื่อง Packard Liquid Scintillation : Gamma Counter, Model 3320.

ผลการทดลอง

ในตอนแรกสุดของผลการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยได้แบ่งเอาบางส่วนของ CUP มาวิเคราะห์หาระดับโปรตีน, คาร์โบฮัยเดรท และกรดไซอาลิคที่อยู่ในรูปของ N-acetylneuraminic Acid (NANA) รวมทั้งตรวจวัดความสามารถของฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีติน (รูปที่ 1) เพื่อพิสูจน์ว่าในปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางที่นำมาศึกษานี้มีฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีติน และฮอร์โมนชนิดนี้ประกอบไปด้วยโปรตีน คาร์โบฮัยเดรทและกรดไซอาลิคจริง แล้วค่อยดำเนินการแยกและเตรียมฮอร์โมนชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ต่อไป จากผลที่ปรากฏในรูปที่ 1 แสดงให้เห็นชัดเจนว่าอีริทโธรปอยอีตินจากปัสสาวะของคนไข้เหล่านี้มีธรรมชาติทางเคมีเป็นสารประกอบพวกกลัยโคโปรตีน

สำหรับการแยกและเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรอีตินจาก CUP ทั้ง 6 ขั้นตอน ซึ่งอาศัยเทคนิคของ column chromatography ชนิดต่าง ๆ ดังปรากฏในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางทั้ง 8 ราย ซึ่งเริ่มต้นด้วยปริมาตรสุทธิ 30 ลิตรนั้น จะได้ CUP ปริมาณ 2,360 มิลลิกรัม และมีความสามารถเฉพาะของฮอร์โมนเท่ากับ 686.80 Co Units per mg ของโปรตีน ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์มากถึง 6,733 เท่าของ CUP (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและความสามารถของฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินจาก Crude Urinary Powder ของคนไข้โรคโลหิตจางชนิด Aplastic

= Proteins

= Carbohydrates

= Erythropoietic Activity

= N-acetylneuraminic Acid

ตารางที่ 1 ผลของการแยกและเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินให้บริสุทธิ์จากปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางชนิด aplastic

Steps	Procedure	Yield (mg)	Specific Activity (Co Units/mg)	Purification Factor
	Crude Urinary Powder (CUP)	2,360	0.12	1
1	DEAE-Cellulose Column I	1,200	1.08	11
2	Hydroxyapatite-Deatomite Column	450	8.65	85
3	Sephadex G-25 Column	180	19.98	169
4	DEAE-Cellulose Column II	120	145.88	1,430
5	Sephadex G-100 Column I	90	465.50	4,564
6	Sephadex G-100 Column II	65	686.80	6,733

อภิปราย

จากรายงานที่ทำการศึกษาเรื่องฮอร์โมนอีริทโธปอยอีตินก่อนหน้านี้ [2,6,9,13] พบว่าคนไข้ที่เป็นโรคโลหิตจางมีการสร้างและหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้ออกมาจากไตสู่กระแสเลือดในระดับที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ และจะสามารถตรวจหาระดับของฮอร์โมนนี้ได้สูงเช่นกัน ในปัสสาวะของคนไข้เหล่านี้ด้วย และจากรายงานของ Koonanuwatchaidet [6] เร็ว ๆ นี้ ยังพบอีกว่าในบรรดาคนไข้โรคโลหิตจางนานาชนิดนั้นคนไข้โรคโลหิตจางชนิด Aplastic จะมีปริมาณของอีริโธรปอยอีตินสูงที่สุด คณะผู้วิจัยจึงมุ่งทำการแยก และเตรียมอีริทโธรปอยอีตินให้บริสุทธิ์จากปัสสาวะของคนไข้โรคโลหิตจางชนิด aplastic แต่ความบริสุทธิ์ของฮอร์โมนที่ได้จากรายงานนี้ยังไม่มากพอเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ อาทิ จากผลการศึกษาของ Fisher และคณะ[13] ซึ่งสามารถแยกและเตรียมอีริทโธรปอยอีตินที่มีความสามารถได้ถึงประมาณ 7,000 Co Units per mg ของโปรตีน การที่เราเตรียมฮอร์โมนชนิดนี้ได้ความบริสุทธิ์ยังค่อนข้างต่ำอาจเป็นเพราะว่าในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ จะมีการสูญเสียหรือทำลายองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง องค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบฮัยเดรท เช่น amino sugars, กรดไซอาลิค เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่มีความสำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ทางชีวภาพของอีริทโธรปอยอีติน [2,3,11,15,16] อย่างไรก็ดีฮอร์โมนที่เตรียมได้จากการศึกษาในรายงานนี้ น่าจะถูกนำเอาไปใช้ในการวิจัยทางชีวเคมีในแง่มุมต่าง ๆ ได้

เนื่องจากประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคโลหิตจางนานาชนิดจำนวนมากมาย คณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดว่าควรจะมีการสนับสนุนที่จะนำเอาพลาสมา หรือปัสสาวะของผู้ป่วยเหล่านี้มาแยกให้และเตรียมฮอร์โมนอีริทโธรปอยอีตินให้มีความบริสุทธิ์มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ทำให้เราไม่ต้องพึ่งพาผลิตภัณฑ์ที่สั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ถึงแม้จำเป็นต้องปรับปรุงแก้ไขเทคนิคเชิงวิชาการบางอย่างก็ตาม เมื่อเราสามารถเตรียมฮอร์โมนชนิดนี้ให้บริสุทธิ์มากที่สุดแล้ว อาจนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์และสาธารณสุข [7,8,9,10,17,18,19,20] ของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณแด่หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ประวัติและข้อมูลของคนไข้ รวมทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ และขอขอบคุณ คุณวงษ์เพชร คนล่ำ ในการพิมพ์ต้นฉบับผลงานวิจัยนี้ด้วย.

เอกสารอ้างอิง

1. Krantz SB. Erythropoietin. Blood 1991 ; 77 : 419-34.
2. Goldwasser E. The biology of erythropoietin. Blood Purif 1991 ; 9 : 119-22.
3. Koury ST, Bachmann S. Erythropoietin production by the kidney. Semin Nephrol 1993 ; 13 : 78-86.
4. Bunn HF. Erythropoietin : Current Status. Yale J Biol Med 1990 ; 63 : 381-6.
5. Beru N. Studies of the effect of erythropoietin on heme synthesis. Adv Exp Med Biol 1989 ; 27 : 87-94
6. Koonanuwatchaidet P, Suttajit M. Comparative erythropoietin levels in urine of the anemic and malnourished patients. Srinagarind Hosp Med J 1993 ; 8 : 91-96
7. Dessypris EN. Erythropoietin : Regulation of erythropoiesis and clinical use. Adv Pharmacol 1990 ; 21 : 127-47.
8. Montini G, Pattra MM, Abraham AA, et al. Benefits and risks of anemia correction with recombinant human erythropoietin in children maintained by hemodialysis. J Pediatr. 1990 ; 117 : 556-60.
9. Das RE, Salvesen DR, Camacho J. Serum immunoreactive erythropoietin in patients with idiopathic aplastic and Fanconi's anemias. Br J Haematol. 1992 ; 82 : 601-7.
10. Green D, Koestner JA, McGraw JP, et al. Erythropoietin for anemia in Jahova's witnesses. Ann Intern Med 1990 ; 113 : 720-1.
11. Koury MJ. The molecular mechanism of erythropoietin action. Eur J Biochem 1992 ; 210 : 649-63.
12. Winzler RJ, Aminoff D. Methods of biochemical analysis II. Interscience Publication. New York : Academic Press, 1975.
13. Fisher JW, Thomson JE, Espada J. Preparation and characterization of erythropoietin from anemic patients' plasma. Isr J Med Sci 1976 ; 7 : 873-80.
14. Alippi RM, Montini C, Schwall R. Higher erythropoietin secretion in response to cobaltous chloride in post-hypoxic than in hypertransfused polycythemic mice. Haematologica 1992 ; 77 : 446-9.
15. Jelkman, W. Erythropoietin:structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992 ; 72: 449-89.
16. Fukuda M, Wasley LC, Imai N. Structure and role of carbohydrates in human erythropoietin. Adv Exp Med Biol 1989 ; 271 : 53-67
17. Pedrazzini A. Current and potential applications for erythropoietin. Acta Haematol 1992 ; 87 (Suppl.) : 28-33.
18. Tabbara IA. Erythropoietin : Biology and clinical applications. Arch Intern Med 1993 ; 153 : 298-304.
19. Duff DR, Barany P, Auer J, et al. Low-dose recombinant human erythropoietin therapy in chronic hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 1991 ; 18 : 60-64.
20. Matsumoto T, Suwata J, Kuramochi S, et al. Effect of recombinant human erythropoietin on anticancer drug-induced anemia. Br J Haematol 1990 ; 75 : 463-8.