

Recombinant Human Erythropoietin: Manfaat dalam Bidang Kedokteran

Recombinant Human Erythropoietin: Benefits in Veterinary Medicine

Yanuartono, Hary Purnamaningsih, Alfarisa Nururrozi, Soedarmanto Indarjulianto*, Slamet Raharjo

Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Depok, Sleman. 55281 Yogyakarta

*Email: indarjulianto@ugm.ac.id

Naskah diterima : 22 Januari 2019, direvisi : 2 Mei 2019, disetujui : 30 Mei 2019

Abstract

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is one of the biotechnology-based drugs that are needed by the human medicine and has also been used in the veterinary medicine. Currently RhEPO has been widely used in the world of human medicine for the treatment of anaemia caused by renal failure, cancer, chronic inflammation and AIDS. In veterinary medicine, although there is still not much data on its achievements, rhEPO has also been used for cases of chronic renal failure in dogs and cats. However, since rhEPO is not identical to feline EPO and canine EPO, some patients eventually produce antibodies against the drug. The antibodies not only prevent EPO therapy from being effective, but also may lead to severe and life-threatening anemia. This paper provides a review of the use of RhEPO, rfEPO and rcEPO in veterinary medicine, especially for the purpose of non-regenerative anemia therapy in cases of chronic renal failure in dogs and cats.

Keywords: anaemia; cat; chronic renal failure; dog; recombinant human erythropoietin

Abstrak

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) adalah salah satu obat berbasis bioteknologi yang sangat dibutuhkan dunia kedokteran manusia dan juga telah dimanfaatkan juga dalam dunia kedokteran hewan. Saat ini rhEPO telah digunakan secara luas dalam dunia kedokteran manusia untuk terapi anemia yang disebabkan oleh gagal ginjal, kanker, peradangan kronis dan AIDS. Dalam dunia kedokteran hewan, meskipun masih belum banyak data keberhasilannya, rhEPO juga telah dimanfaatkan untuk pengobatan kasus gagal ginjal akut dan kronis pada anjing dan kucing. Namun, karena rhEPO tidak identik dengan EPO kucing (rfEPO) dan EPO anjing (rcEPO), beberapa hewan menghasilkan antibodi terhadap rhEPO tersebut. Antibodi tidak hanya mencegah terapi EPO menjadi efektif, tetapi juga dapat menyebabkan anemia berat dan mengancam jiwa. Tulisan ini mencoba memberikan ulasan pemanfaatan rhEPO dalam dunia kedokteran hewan terutama untuk tujuan terapi anemia non regeneratif kasus penyakit ginjal kronis pada anjing dan kucing. Dengan ulasan singkat ini diharapkan dunia kedokteran hewan di Indonesia mulai mencoba menggunakan rhEPO rfEPO dan rcEPO untuk tujuan terapi pada hewan kesayangan khususnya anjing dan kucing.

Kata kunci: anjing; anemia; gagal ginjal kronis; kucing,; *recombinant human erythropoietin*

Pendahuluan

Erythropoietin (EPO) adalah hormon glikoprotein 30,4 kDa yang merupakan regulator utama produksi eritrosit sebagai respon terhadap penurunan oksigenasi pada jaringan (Jelkmann, 2013). *Erythropoietin* terutama diproduksi oleh sel interstitial

peritubular korteks ginjal korteks ginjal (Koury *et al.*, 1988; Eschbach, 1989) dan sebagian kecil oleh hati, meskipun semua sel pada dasarnya memiliki kemampuan mentranskrip gen Epo dalam kondisi hipoksia (Koury *et al.*, 1989). Produksi EPO oleh hati terutama terjadi pada periode janin dan perinatal dan

produksi oleh ginjal mendominasi selama masa dewasa (Ifeanyi and Uzoma, 2016). Kekurangan hormon EPO pada penderita penyakit gagal ginjal kronis menjadi penyebab utama anemia non regeneratif. Menurut Yin and Blanchard (2000) salah satu obat berbasis bioteknologi yang sangat dibutuhkan dunia kedokteran manusia dan juga telah dimanfaatkan juga dalam dunia kedokteran hewan saat ini adalah *recombinant human erythropoietin* (rhEPO). *Epoetin alpha*, *epoetin beta*, *epoetin omega* dan *epoetin delta* adalah klasifikasi nama komersial rhEPO yang saat ini sudah tersedia di pasar untuk tujuan terapi (Storring *et al.*, 1998; Skibeli *et al.*, 2001). Klasifikasi didasarkan atas perbedaan struktur kimia dan metode pembuatannya dimana perbedaan struktur kimia terdapat pada kadar oligosakarida. *Epoetin alfa* (39% oligosakarida), *epoetin beta* (24% oligosakarida), dan *epoetin omega* (21% oligosakarida), namun demikian tidak terdapat perbedaan dalam efikasi dan farmakologinya (Loughnan *et al.*, 2011; Fuadi and Bisri, 2015). Berdasarkan metode pembuatannya, *epoetin alpha* dan *epoetin beta* disintesis dari *ovarian cells of Chinese hamster* (CHO), sedangkan *epoetin omega* disintesis dari sel sel ginjal hamster (BHK) (Choi *et al.*, 1996). Saat ini rhEPO telah digunakan secara luas dalam dunia kedokteran manusia untuk terapi anemia yang disebabkan oleh gagal ginjal, kanker, peradangan kronis dan AIDS (Goodnough *et al.*, 2000; Jelkmann, 2000; Bron *et al.*, 2001; Conley *et al.*, 2009). *Recombinant human erythropoietin* telah dibuat dari berbagai sumber seperti bakteri (Huang, 1984), kultur sel mamalia (Goto *et al.*, 1988), sel serangga (Kim *et al.*, 2005), susu kambing transgenik (Toledo *et al.*, 2006) dan ragi (Hamilton *et al.*, 2006). *Recombinant Human erythropoietin* (rhEPO) sudah digunakan dalam pengobatan klinik pada pasien manusia penderita anemia, khususnya disebabkan

oleh gagal ginjal pada sejak tahun 1988. Sampai saat ini rhEPO yang digunakan secara luas untuk terapi adalah berasal dari kultur sel mamalia meskipun teknis pembuatannya lebih kompleks dan memerlukan biaya yang tinggi. Meskipun demikian, menurut (Hoeksema (2011) dan Surabattula *et al.* (2011) produksi rhEPO masih perlu penelitian lebih mendalam untuk mengoptimalkan penggunaan peran rhEPO dalam dunia kedokteran, baik manusia maupun hewan.

Recombinant human erythropoietin telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai macam kepentingan seperti penelitian dampak rhEPO pada hewan coba dan untuk terapi anemia non regeneratif pada penyakit gagal ginjal kronis. Penelitian dampak rhEPO telah dilakukan dengan hewan coba tikus (Sadamoto *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2013), mencit (Bernaudin *et al.*, 1999; Rodrigue *et al.*, 2008), *macaques* (Gao *et al.*, 2004). Dalam dunia kedokteran hewan, meskipun masih belum banyak data keberhasilannya, rhEPO juga telah dimanfaatkan untuk pengobatan kasus gagal ginjal akut dan kronis pada anjing dan kucing (Randolph *et al.*, 2004; Langston *et al.*, 2017). Tulisan ini mencoba memberikan ulasan pemanfaatan rhEPO dalam dunia kedokteran hewan terutama untuk tujuan terapi anemia non regeneratif kasus penyakit ginjal kronis pada anjing dan kucing. Dengan ulasan singkat ini diharapkan dunia kedokteran hewan mulai mencoba menggunakan rhEPO untuk tujuan terapi pada hewan kesayangan khususnya anjing dan kucing.

Struktur dan Fungsi rhEPO

Eritropoietin atau disebut juga hematopoietin atau hemopoietin adalah hormon glikoprotein dengan berat molekul 30-39 Kd yang dihasilkan oleh sel peritubular ginjal untuk menstimulasi sumsum tulang agar melakukan proses eritropoiesis, juga berperan

dalam proses proliferasi, maturasi, dan pelepasan retikulosit (Coleman and Brines, 2004). Gen eritropoietin manusia terletak di kromosom 7q11-22, tersusun atas lima akson dan empat intron, yang menghasilkan tulang punggung polipeptida tunggal pasca-transkripsional dan mengandung 193 asam amino (Law *et al.*, 1986; Eschbach *et al.*, 1987; Jelkmann, 1992). Namun, selama modifikasi pasca-translasi terjadi pemecahan asam-asam amino di 27 N-terminal dan arginin C-terminal sehingga struktur Epo akhirnya hanya mengandung 136 asam amino (Imai *et al.*, 1990). *Recombinant human erythropoietin* (rhEPO) adalah hasil rekayasa genetik (*recombinant DNA technology*) yang identik eritropoietin endogen dan mengandung protein kecil yang tersusun dari 165 *amino acid glycoprotein* dengan berat molekul 30.000 Dalton (Egrie, 1990; Inoue *et al.*, 1995). *Recombinant human erythropoietin* mempunyai sifat biologis dan kimia yang sama dengan eritropoietin endogen (Jacobs *et al.*, 1985; Eder *et al.*, 1989). Faktor yang membedakan antara bentuk rekombinan dan eritropoietin endogen adalah pada pola glikosilasi dari bentuk rekombinan lebih besar, sehingga aktivitas biologis *in vivo* eritropoietin endogen (70.000 IU/mg) lebih rendah daripada eritropoietin rekombinan (200.000 IU/mg). Rantai glikosilasi rhEPO memiliki peran penting dalam hal biosintesis, struktur molekul dan aktivitas biologis (Elliott *et al.*, 2008).

Penelitian-penelitian awal menunjukkan bahwa secara *in vivo* keberadaan glikosilasi sangat esensial agar EPO dapat menjalankan fungsinya dengan baik (Browne *et al.*, 1986; Egrie *et al.*, 1986). Sedangkan secara *in vitro*, glikosilasi tidak berpengaruh terhadap fungsi dan kinerja EPO. Studi lain menunjukkan bahwa ada hubungan yang erat antara glikosilasi pada rhEPO dengan waktu paruhnya (*half-life*) di mana dengan semakin meningkatnya

kandungan asam sialat waktu paruh dan aktivitas biologi *in vivo* juga akan meningkat. Hal ini mengindikasikan bahwa molekul hEPO dengan kandungan asam sialat yang tinggi akan mempunyai aktivitas biologis yang lebih baik (Delorme *et al.*, 1992; Egrie and Browne 2001). Sebaliknya, derajat glikosilasi tidak berpengaruh pada kemampuan klinisnya, meskipun jumlah glikosilasi akan berpengaruh pada frekuensi pemberiannya (Storring *et al.*, 1998; Langston *et al.*, 2003)

Penggunaan rhEPO Dalam Dunia Kedokteran

Selama dua dekade terakhir dalam dunia kedokteran manusia, rhEPO menjadi terapi standar dalam penyembuhan anemia kronis (Jelkmann, 2008) dan penderita gagal ginjal kronis (Tamadon and Beladi-Mousavi, 2013) penderita kanker (Kumar *et al.*, 2017), AIDS (Ifudu *et al.*, 1997) dan rheumatoid arthritis (Peeters *et al.*, 1999). Penelitian aktivitas rhEPO telah banyak dilakukan dengan menggunakan kultur sel berdasarkan berbagai macam *cell lines* seperti *Erythropoietin-dependent human leukemia* (AS-E2), *human erythroleukaemia* TF1, dan *megakaryocytic cell line* UT-7 (Miyazaki *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1998). Namun, uji tersebut adalah *in vitro* sehingga memiliki kelemahan karena tidak mampu membedakan antara EPO utuh dengan varian asialo atau aglikosilasinya yang kebanyakan memiliki waktu paruh lebih pendek sehingga bioaktivitasnya sangat menurun bila diberikan *in vivo* (Barth *et al.*, 2008).

Penelitian-penelitian penggunaan rhEPO dengan melibatkan berbagai macam hewan coba sebagai model juga telah banyak juga dilakukan. Penggunaan hewan model untuk mengetahui potensi rhEPO pada awalnya dilakukan pada tikus dan mencit dengan mengikuti perkembangan dan perubahan beberapa parameter seperti hematokrit, volume sel darah merah dan jumlah retikulosit (Eder *et al.*, 1989;

Choi *et al.*, 1996). Garrido *et al.* (2010) melakukan penelitian dengan menggunakan hewan model tikus wistar jantan penderita penyakit ginjal kronis moderat untuk mengetahui kemampuan rhEPO melindungi ginjal, dampak peradangan dan stress oksidatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rhEPO mampu memperbaiki kondisi anemia, menurunkan tekanan darah dan menurunkan dampak merusak akibat stress oksidatif yang muncul pada penyakit ginjal kronis moderat. Hasil penelitian oleh Bernado *et al.* (2016) menunjukkan bahwa pemberian rhEPO pada tikus *Sprague-Dawley* terbukti meningkatkan proses penyembuhan fraktur tulang mandibula yang ditandai dengan peningkatan osteoblastogenesis dan osteoklastogenesis yang tampak dari peningkatan jumlah osteoblas dan osteoklas. Ramakrishnan *et al.* (2003) telah melakukan penelitian pengaruh pemberian rhEPO terhadap farmakodinamik dan farmakokinetik retikulosit, sel darah merah dan Hb pada *Cynomolgus Monkeys*. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *Cynomolgus Monkeys* dapat digunakan sebagai hewan model farmakodinamik dan farmakokinetik rhEPO. Studi menggunakan hewan coba tikus *Sprague Dawley* yang diinjeksi menggunakan rhEPO dapat mempercepat proses re epitelialisasi dan penyembuhan luka yang disebabkan oleh luka bakar dermis dalam (Sandhi, 2015). Hasil penelitian penelitian *in vitro* maupun *in vivo* dengan menggunakan hewan model tersebut menekankan arti penting upaya lanjut untuk meningkatkan dan menyempurnakan metodologi penggunaan rhEPO yang telah ada sehingga hasilnya dapat diimplementasikan untuk kepentingan medis dalam dunia kedokteran manusia maupun hewan.

Terapi Anemia Anjing dan Kucing Menggunakan rhEPO.

Dalam dunia kedokteran hewan rhEPO juga

telah dimanfaatkan untuk pengobatan kasus gagal ginjal akut dan kronis pada anjing dan kucing (Boran *et al.*, 1993). Menurut Bugelski *et al.* (2008), *human EPO* secara biologis menjadi aktif ketika diberikan kepada hewan dan pemberian *human EPO* akan memperbaiki kondisi anemia karena defisiensi EPO pada anjing nefrektomi (Oishi *et al.*, 1995). Pada kucing dan anjing, salah satu gejala klinis progresif terkait dengan gagal ginjal kronis adalah anemia non regeneratif. Hasil penelitian pada manusia juga menunjukkan bahwa kasus gagal ginjal kronis disertai anemia non regeneratif memiliki angka konsentrasi serum eritropoietin yang rendah (Andrews *et al.*, 2014). *Recombinant human erythropoietin* sebenarnya tidak direkomendasikan untuk digunakan pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing, oleh sebab itu pemilik wajib untuk menandatangani dokumen kesediaan untuk penggunaan pada hewannya. Sebelum diberikan, perlu dipertimbangkan potensi munculnya reaksi yang merugikan pada pasien gagal ginjal kronis dengan tanda-tanda klinis yang disebabkan anemia sebelum terapi rhEPO diberikan (Langston *et al.*, 2003). Anemia non regeneratif merupakan konsekuensi penyakit gagal ginjal kronis yang tidak dapat dihindari meskipun ada beberapa faktor lain yang turut berperan seperti penurunan *life span* eritrosit dan perdarahan gastrointestinal. Meskipun demikian, penyebab paling dominan pada kejadian anemia non regeneratif pada anjing penderita penyakit gagal ginjal kronis adalah berkurangnya produksi EPO dari ginjal (King *et al.*, 1992). Sanderson (2005) menambahkan bahwa rhEPO adalah pengobatan pilihan untuk kondisi anemia yang tidak mengancam jiwa pada anjing dan kucing penderita gagal ginjal kronis. Terapi tersebut dianjurkan jika gejala klinis anemia mulai muncul dan pemeriksaan laboratoris menunjukkan nilai hematokrit turun di bawah 20%.

Henry (1994) menggunakan rhEPO untuk

terapi kucing penderita gagal ginjal kronis dengan status anemia. Dosis yang digunakan adalah 100U/kg BB subkutan 3 kali seminggu, setelah 10 hari pengobatan memberikan hasil peningkatan, hematokrit mengalami peningkatan menjadi 0,31 dari sebelumnya 0,16. Cowgill *et al.*, (1998) melakukan pengujian efikasi dan keamanan rhEPO secara intravena dan subkutan pada 6 ekor anjing dan 11 ekor kucing penderita gagal ginjal kronis. Terapi tersebut mampu meningkatkan jumlah sel darah merah (SDM), retikulosit dan konsentrasi Hb. Hasil pemeriksaan secara klinis juga menunjukkan adanya variasi peningkatan nafsu makan, berat badan, kewaspadaan dan kemauan untuk bermain. Meskipun demikian, terapi tersebut juga menimbulkan efek samping yang beragam dan tidak konsisten. Efek samping yang sering muncul adalah anemia, peningkatan antibodi anti-rhEPO, kejang, hipertensi sistemik dan defisiensi zat besi. Hasil penelitian maupun studi kasus terdahulu menunjukkan bahwa pemberian rhEPO pada anjing dengan status anemia non regeneratif sekunder akibat penyakit ginjal kronis mampu menginduksi respon eritrosit secara cepat. Namun sayangnya, beberapa anjing yang dirawat memperlihatkan respon positif singkat sebelum akhirnya mati karena munculnya antibodi terhadap rhEPO (Mikiciuk *et al.*, 1990; Cowgill, 1991; Giger, 1992; Langston *et al.*, 2003). Penelitian oleh Fiocchi *et al.* (2017) menunjukkan beberapa efek samping yang muncul setelah pemberian *Darbepoetin alfa* pada anjing penderita penyakit ginjal kronis. Efek samping paling banyak ditemukan adalah peningkatan tekanan darah sistolik. Dua puluh lima anjing yang diperiksa tekanan darahnya, 24 anjing mengalami peningkatan tekanan darah sistolik dan efek samping pada gastrointestinal yang berupa diare ditemukan pada 1 anjing. Efek samping tersebut hanya berlangsung satu hari setelah pengobatan. Sanderson (2005)

menyarankan untuk melakukan evaluasi tekanan darah pada pasien sebelum memulai terapi r-HuEPO. Pemantauan dan terapi tekanan darah sistemik harus dilakukan jika tekanan darah kucing meningkat dan dosis yang diberikan harus diturunkan untuk mencegah peningkatan tekanan darah yang cepat.

Studi kasus yang lain menunjukkan bahwa pada beberapa pasien, kondisi anemia menjadi lebih buruk dibandingkan dengan sebelum terapi dengan menggunakan rhEPO. Menurut Wen *et al.* (1993), aktivitas biologis *erythropoietin* antara anjing, kucing dan manusia menunjukkan kemiripan karena 85% homolog dengan *erythropoietin* manusia. Meskipun aktivitas biologis EPO dari spesies mamalia lain seperti anjing dan kucing mirip dengan EPO manusia, namun ada perbedaan antigenik spesies-spesifik. Perbedaan antigenik spesies-spesifik tersebut kemungkinan akan mengakibatkan pembentukan antibodi anti-EPO. Selain hal tersebut, perbedaan antigenik spesies-spesifik diduga akan menimbulkan masalah dalam ketepatan menentukan kadar serum *erythropoietin* anjing atau kucing karena menggunakan *erythropoietin* manusia sebagai dasar uji (Giger, 1991). Pendapat tersebut didukung oleh MacLeod *et al.* (1998) yang membuktikan bahwa ada sekitar 18,7% perbedaan sekuens asam amino primer antara rhEPO dengan *recombinant canine erythropoietin* (rcEPO) sehingga berpotensi meningkatkan antibodi terhadap EPO. Lebih lanjut MacLeod, (2001) menambahkan bahwa dengan adanya berbagai macam variasi dalam struktur molekul *erythropoietin* pada anjing dan kucing untuk dapat mengenali rhEPO sehingga berdampak pada peningkatan antibodi terhadap rhEPO. Antibodi yang diproduksi oleh kucing dan anjing setelah pengobatan dengan rhEPO tidak hanya memblokir aktivitas rhEPO, tetapi juga mungkin memiliki potensi untuk mengenal reaksi silang *erythropoietin* endogen, yang

dapat menyebabkan gangguan pada sumsum tulang dan disebut dengan aplasia sel darah merah. Sanderson (2005) menyatakan bahwa pembentukan antibodi diperkirakan terjadi pada sekitar 50% anjing dan kucing yang menerima terapi rhEPO. Pembentukan antibodi tersebut memiliki kecenderungan terjadi dalam waktu sekitar 1 sampai 6 bulan setelah terapi rhEPO dimulai. Respon antibodi yang dapat bertahan lama tersebut membuat hewan memerlukan transfusi darah untuk mencegah kondisi anemia dan berakibat pada tingginya pengambilan keputusan euthanasia pada hewan terdampak (Chalhoub *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2011).

Cowgill *et al.* (1998) menemukan hasil yang menarik karena setelah 4 minggu terapi rhEPO anjing mengalami hipoplasia eritroid, meskipun produksi sel darah merah pulih 5 hingga 11 minggu setelah terapi rhEPO dihentikan. Oleh sebab itu, pemberian rhEPO pada anjing masih memerlukan pertimbangan dari sisi manfaat maupun risiko sebelum tersedianya bentuk erythropoietin rekombinan yang homolog. Hasil penelitian Chalhoub *et al.* (2012) menunjukkan bahwa pemberian *darbepoetin* pada kucing penderita penyakit ginjal kronis mampu merangsang eritropoiesis dan membantu memperbaiki kondisi anemia. Dosis awal 1,0 µg/kg SC sekali seminggu tampaknya memberikan respon yang lebih baik daripada dosis yang lebih rendah, dan suplementasi preparat Fe sangat dianjurkan selama pengobatan *darbepoetin* karena merupakan komponen penting pembentukan hemoglobin. Pemberian rhEPO tanpa disertai dengan pemberian preparat Fe akan memperparah kondisi defisiensi Fe pada hewan penderita (Eschbach *et al.*, 1989; Randolph *et al.*, 1999). Preparat Fe yang dapat digunakan adalah *Ferrous sulfate* per oral dengan dosis 100-300 mg/hari untuk anjing, sedangkan untuk kucing dosis yang dianjurkan adalah 50-100 mg/hari (Langston *et al.*, 2003). Jika hewan dalam kondisi

muntah akibat pemberian preparat Fe peroral maka dianjurkan untuk menggunakan *Fe dextran* intramuskuler dengan dosis 10-20 mg/kg untuk anjing dan total 50mg/ekor kucing setiap bulan. Sebaliknya Henry (1994) menyatakan tidak perlu memberikan suplementasi preparat Fe karena selama pengobatan dengan rhEPO nilai serum Fe, *total iron binding capacity* (TIBC) dan saturasi transferin masih dalam kisaran normal. Meskipun terjadi perbedaan pendapat, Sanderson (2005) menyarankan evaluasi status Fe sebelum memulai terapi dengan terapi rhEPO. Saran tersebut didasarkan pada adanya respon eritropoietik dari rhEPO membutuhkan mobilisasi Fe dalam jumlah yang besar dari simpanan jaringan untuk mendukung sintesis hemoglobin. Kegagalan pemberian Fe dalam jumlah yang memadai dapat menyebabkan lemahnya respons terhadap terapi rhEPO atau bahkan tidak ada respon sama sekali.

Terapi Anemia Anjing dan Kucing Menggunakan rfEPO atau rcEPO.

Konsep penggunaan EPO sampai saat ini tampaknya sudah tepat untuk terapi hewan kesayangan pada kondisi anemia yang disebabkan oleh gagal ginjal kronis. Permasalahan utama dalam penggunaan rhEPO adalah imunogenisitas rhEPO. Penelitian MacLeod *et al.* (1998) membuktikan bahwa terdapat sekitar 18,7% perbedaan sekuens asam amino primer antara rhEPO dengan *recombinant canine erythropoietin* (rcEPO) sehingga berpotensi meningkatkan respon antibodi terhadap EPO. MacLeod, (2001) menyatakan saat ini telah ada pengembangan penelitian untuk mengatasi adanya berbagai macam variasi dalam struktur molekul *erythropoietin* antar spesies hewan untuk menekan dampak pada peningkatan tanggapan kekebalan terhadapnya. Randolph *et al.* (1999) melakukan penelitian untuk membandingkan pengaruh pemberian rhEPO dan RcEPO pada 13 anjing sehat. Hasil

penelitiannya menunjukkan bahwa terapi dengan rcEPO selama kurun waktu 24 minggu mampu menstimulasi produksi eritrosit tanpa satupun anjing yang mengalami hipoplasia erythroid. Penelitian lanjut yang dilakukan oleh Randolph *et al.* (2004) menunjukkan bahwa *recombinant canine erythropoietin* (rcEPO) merangsang produksi eritrosit anjing penderita gagal ginjal kronis dengan status anemia dengan periode pengobatan selama 1 tahun tanpa muncul efek samping aplasia sel darah merah seperti terapi dengan menggunakan rhEPO. Selanjutnya dia menyimpulkan bahwa rcEPO dapat menjadi pilihan yang lebih baik untuk terapi anemia non regeneratif pada anjing dibandingkan dengan penggunaan rhEPO, meskipun masih dijumpai beberapa kendala dalam penggunaan rcEPO.

Recombinant human erythropoietin telah digunakan pada kucing untuk memperbaiki kondisi anemia dengan keberhasilan yang beragam. Namun demikian, karena rhEPO tidak identik *recombinant feline erythropoietin* (rfEPO), beberapa kucing akhirnya menghasilkan antibodi terhadap obat tersebut. Pembentukan antibodi tidak hanya membuat terapi rhEPO menjadi kurang efektif, tetapi juga dapat mengakibatkan anemia menjadi lebih berat serta dapat mengakibatkan kematian kucing. Saat ini Laboratorium Dr. James MacLeod di Cornell University telah mengembangkan metode untuk memproduksi *recombinant feline erythropoietin* (rfEPO) dalam jumlah yang cukup besar untuk terapi anemia kucing penderita gagal ginjal kronis. Pengembangan produksi rfEPO diharapkan mampu mengatasi kondisi anemia pada kucing penderita gagal ginjal kronis tanpa efek samping yang muncul seperti pada penggunaan rhEPO. Meskipun demikian, munculnya efek samping berupa aplasia sel darah merah juga teramati pada kucing yang diterapi dengan rfEPO. Melihat hasil penggunaan rfEPO dan rhEPO

yang kurang optimal untuk terapi pada kucing, Randolph *et al.* (2004) menyarankan pemberian fEPO melalui terapi gen mungkin merupakan solusi ideal.

Beall *et al.* (2000) melakukan pengembangan terapi anemia non regeneratif pada kucing penderita gagal ginjal kronis dengan menggunakan *recombinant vector containing the feline erythropoietin gene* (rAAV/feEpo). Dalam penelitiannya, rAAV/feEpo mampu meningkatkan kadar hematokrit lebih dari 7 minggu setelah injeksi intramuskuler pada kucing sehat. Hasil tersebut tampaknya cukup menjanjikan untuk mengatasi kondisi anemia non regeneratif pada kasus gagal ginjal kronis kucing.

Kesimpulan

Recombinant human erythropoietin untuk terapi anemia non regeneratif pada kucing dan anjing meskipun masih banyak memiliki kelemahan namun masih menjadi pilihan praktisi dokter hewan. Keuntungan penggunaan rhEPO saat ini lebih ditekankan pada harga yang lebih terjangkau jika dibandingkan dengan rcEPO atau rfEPO serta lebih mudah diperoleh dipasaran. Namun demikian masih diperlukan penelitian untuk meminimalisir dampak negatif yang muncul pada penggunaan rhEPO untuk terapi anemia non regeneratif pada kucing dan anjing. Dimasa mendatang masih diperlukan pengembangan lebih lanjut rfEPO dan rcEPO guna menggantikan peran rhEPO sebagai agen terapi anemia non regeneratif kucing dan anjing. Ketersediaan rfEPO dan rcEPO di masa mendatang mungkin menjadi pilihan pengobatan yang aman dan efektif untuk pasien kucing dan anjing penderita anemia non regeneratif yang terkait dengan gagal ginjal kronis

Daftar Pustaka

Andrews, D.A., Pyrah, I.T.G., Boren, B.M., Tannehill-Gregg, S.H., And Ruth M. Lightfoot-Dunn, R.M. (2014). High

- Hematocrit Resulting from Administration of Erythropoiesis-stimulating Agents Is Not Fully Predictive of Mortality or Toxicities in Preclinical Species. *Toxicologic Pathology*, 42 : 510 - 523 . D O I : 10.1177/0192623313486317
- Barth, T., Oliveira, P.R., Felipe, B., D'avila, F.B. And Dalmora. S.L. (2008). Validation of the Normocythemic Mice Bioassay for the Potency Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Formulations. *Journal Of Aoac International*. 91 (2): 85-291. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003001100014>
- Beall, C.J., Phipps, A.J., Mathes, L.E., Stromberg, P., And Johnson, P.R. (2000) Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector. *Gene Therapy* 7 (6): 534–539. DOI: 10.1038/sj.gt.3301126
- Bernado, P., Rahardjo, And Rahajoe, P.S. (2016). Pengaruh recombinant human Erythropoietin terhadap jumlah osteoblas, osteoklas dan kadar hemoglobin pada penyembuhan fraktur tulang mandibula. Studi eksperimental pada fraktur mandibula tikus *Sprague-Dawley*. *J Ked Gi*. 7(2): 131-137
- Bernaudin, M., Marti, H.H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T. And Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 19 (6):643–651. DOI:10.1097/00004647-199906000-00007
- Boran, M., Dalva, I., Yazicioglu, A., Akbay, E. And Cetin, S. (1993). Correction of anaemia in haemodialysis patients with recombinant human erythropoietin. *Int Urol Nephrol* 25 (2): 197–203. PMID:8365853
- Bron, D., Meuleman, N. And Mascaux, C. (2001). Biological basis of anemia. *Semin Oncol* 28(2 Suppl 8):1-6. PMID:11395845
- Browne, J.K., Cohen, A.M., Egrie, J.C., Lai, P.H., Lin, F.K., Strickland, T., Watson, E. And Stebbing, N. (1986). Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 (Pt 1) : 693 – 702 . doi:10.1101/SQB.1986.051.01.082
- Bugelski, P. J., Nesspor, T., Volk, A., O'Brien, J., Makropoulos, D., Shamberger, K., Fisher, P. W., James, I., Graden, D., And Capocasale, R. J. (2008). Pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in murine bone marrow. *Pharm Res* 25(2): 369–78. DOI:10.1007/s11095-007-9372-7
- Chalhoub, S., Langston, C.E. And Eatroff, A. (2011). Anemia of renal disease. *J Fel Med Surg*. 13 (9) : 629 - 640 . d o i : 10.1016/j.jfms.2011.07.016.
- Chalhoub, S., Langston, C.E. and Farrelly, J. (2012). The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in Anemia of Chronic Kidney Disease in Cats: 25 Cases. *J Vet Intern Med* 26 (2):363–369. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00864.x
- Chew, D.J., DiBartola, S.P., And Schenck, P. (2011). editors. Chronic renal failure. In *Canine and Feline Nephrology and Urology*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.; 145-96.
- Choi, D., Kim, M. And Park, J. (1996). Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography*. 687(1): 189-199. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00308-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00308-8)
- Coleman, T. And Brines. M. (2004) Science review: Recombinant human erythropoietin in critical illness: a role beyond anemia? *Critical Care* 8 (5): 337-341 DOI 10.1186/cc2897)
- Conley, A.J., Mohib, K., Jevnikar, A.M. And Brandle. J.E. (2009). Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury. *Plant Biotechnology Journal* 7(2): 183–199. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00389.x
- Cowgill, L.D., James, K. M., Levy, J. K, Browne, J.K., Miller, A., Lobingier, R.T., And Egrie, J.C. (1998). Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212 (4): 521 - 528 . PMID:9491159
- Cowgill, L.D. (1991). Erythropoietin: Its use in the

- treatment of chronic renal failure in dogs and cats. *Proc Annu Waltham/OSU Symp Treat Small Anim Dis.* 15:65–71.
- Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T. And Elliott, S. (1992). Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry.* 31(41): 9871–9876. DOI: 10.1021/bi00156a003
- Eder, H., Roblenbroich, B. And Failing, K. (1989). A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. *Blut.* 59(2): 184-187. PMID:2475191
- Egrie, J. (1990). The cloning and production of recombinant human erythropoietin. *Pharmacotherapy* 10(Pt2):3S–8S. PMID:2345709
- Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J., Aoki, K., Cohen, A.M., Smalling, R., Trail, G., Lin, F.K., Browne, J.K. And Hines, D.K. (1986). Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology.* 172(3-5):213-24. DOI:10.1016/S0171-2985(86)80101-2
- Egrie, J. C. And Browne, J. K. (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer.* 84 (S u p p l 1) : 3 – 1 0 . d o i : 10.1054/bjoc.2001.1746
- Elliott, S., Pham, E. And Macdougall, I.C. (2008). Erythropoietins: A common mechanism of action. *Exp Hematol.* 36(12):1573–84. doi: 10.1016/j.exphem.2008.08.003
- Eschbach, J.W. (1989). The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int.* 35 (1) : 1 3 4 – 1 4 8 . D O I : https://doi.org/10.1038/ki.1989.18
- Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K. And Adamson, J.W. (1987). Correction of the anaemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316 (2) :73–78. DOI: 10.1056/NEJM198701083160203
- Fiocchi, E.H., Cowgill, L.D., Brown, D.C., Markovich, J.E., Tucker, S., Labato, M.A., And Callan, M.B. (2017). The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in the Treatment of Anemia of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med.* 31(2):476–485 DOI: 10.1111/jvim.14681
- Fuadi, I. And Bisri, T. (2015). Efek Proteksi Otak Erythropoietin. *JNI4*(2): 149–56
- Gao, G., Lebherz, C., Weiner, D.J., Grant, R., Calcedo, R., McCullough, B., Bagg, A., Zhang, Y. And Wilson, J.M. (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood.* 103 (9): 3300-3302. doi:10.1182/blood-2003-11-3852
- Garrido, P., Reis, F., Costa, E., Almeida, A., Parada, B.E., Teixeira-Lemos, E., Santos, P., Alves, R., Sereno, J., Pinto, R., Tavares, C.A., Figueiredo, A., Rocha-Pereira, P., Belo, L., Santos-Silva, A. And Teixeira, F. (2010). Effect of Recombinant Human Erythropoietin in a Rat Model of Moderate Chronic Renal Failure – Focus on Inflammation, Oxidative Stress and Function/Renoprotection. *The Open Drug Discovery* 22(2) : 25-32. DOI: 10.2174/1877381801002020025
- Giger U. (1992). Erythropoietin and its clinical use. *Compend Contin Educ Pract Vet* 14 :25–34.
- Giger, U. (1991). Serum erythropoietin concentrations in polycythemic and anemic dogs. *Proc 9th ACVIMForum:*143–145.
- Goodnough, L.T., Skikne, B. And Brugnara, C. (2000). Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*96 (3): 823-833. PMID:10910892
- Goto, M., Akai, K., Murakami, A., Hashimoto, C., Tsuda, E., Ueda, M., Kawanishi, G., Takahashi, N., Ishimoto, A., Chiba, H. And Sasaki, R. (1988). Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Nature Biotechnology.* 6(1): 67–71. DOI: 10.1038/nbt0188-67
- Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.K., Hopkins, D., Wischniewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S. And

Yuartono, *et. al.*

- Gerngross, T.U. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313: 1441–1443. DOI:10.1126/science.1130256
- Henry, P. (1994). Human recombinant erythropoietin used to treat a cat with anemia caused by chronic renal failure. *Can Vet J.* 35(6) :375. PMID: 8069840
- Hoeksema, F. (2011). Selection markers and expression enhancing elements: Novel strategies to create mammalian production cell lines. Faculty of Science. University of Amsterdam. Thesis Dissertation. Available at: <http://dare.uva.nl/document/482571>
- Huang, L.S. (1984). Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(9): 2708-2712. PMID: 6371819
- Ifeanyi, O.E. And Uzoma, O.G. (2016). Erythropoietin and Kidney Diseases: A Review. *J. Biol. Chem. Research.* 33 (2): 760-792
- Ifudu, N., Matthew, J.J., Mayers, J.D., Macey, L.J., Breznsnyak, W., Reydel, C., McClendon, E., Surgrue, T., Sreepada Rao, T.K. And Friedman, E.A. (1997). Severity of AIDS and the response to EPO in uremia. *American Journal of Kidney Diseases* 30 (1): 28-35. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(97\)90561-8](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(97)90561-8)
- Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M., Oh-Eda, M., Orita, T., Kawaguchi, T., And Ochi, N. (1990). Physicochemical and Biological Comparison of Recombinant Human Erythropoietin with Human Urinary Erythropoietin. *Journal of Biochemistry* 107 (3) : 352 - 359 DOI::10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123050
- Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H. And Suzuki, T. (1995) The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev.* 1995 (1) : 297 - 313 . [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)70055-3](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)70055-3)
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufmann, R.J., Mufson, A., Sehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., And Fritsch, E.F. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* 313(6005): 806-810. PMID:3838366
- Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production and function. *Physiol Rev.* 72 (2) : 449 – 89 . DOI : 10.1152/physrev.1992.72.2.449
- Jelkmann, W. (2000). Use of recombinant human erythropoietin as an anti-anemic and performance enhancing drug. *Curr Pharmaceut Biotechnol.* 1(1):11–31. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389201003379068>
- Jelkmann, W. (2008). Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents. *British Journal of Haematology.* 141(3): 287–297 doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06948.x
- Jelkmann, W. (2013). Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. *Transfus Med Hemother.* 40(5):302–309 DOI: 10.1159/000356193
- Kim, Y.K., Shin, H.S., Tomiya, N., Lee, Y.C., Betenbaugh, M.J. And Cha, H.J. (2005). Production and *N*-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 92(4): 452–461. DOI: 10.1002/bit.20605
- King, L.G., Giger, U., Diserens, D., And Nagode, L.A. (1992). Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med.* 6 (5): 264–270. PMID: 1432900
- Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J. And Graber, S.E. (1989). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74(2): 645-51. PMID: 2752138
- Koury, S.T., Bondurant, M.C., And Koury, M.J. (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 71:524–527. PMID:3337914
- Kumar, J., Reccia, I., Kusano, T. And Agrawal, S. (2017). A Systematic Review on the Erythropoietin Receptors Expression in

- Various Cancers and Importance of Recombinant Erythropoietin in Chemotherapy Induced Anaemia. *Hematol Transfus Int J.* 4(1):1-6. DOI: 10.15406/htij.2017.04.00072
- Langston, C., Cook, A., Eatroff, A., Mitelberg, E. And Chalhoub S. (2017). Blood Transfusions in Dogs and Cats Receiving Hemodialysis: 230 Cases (June 1997–September 2012). *J Vet Intern Med.* 31(2): 402–409. DOI:10.1111/jvim.14658
- Langston, C.E., Reine, N.J., And Kittrell, D. (2003). The use of erythropoietin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33(6):1245-1260. PMID:14664197
- Law, M.L., Cai, G.Y., Lin, F.K., Wei, Q., Huang, S.Z., Hartz, J.H., Morse, H., Lin, C. H., Jones, C. And Kao, F. T. (1986). Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83 (18):6920–6924. DOI: 10.1073/pnas.83.18.6920
- Loughnan, A., Galil Rahman Ali, G.R. And Abeygunasekara, S.C. (2011). Comparison of the Therapeutic Efficacy of Epoetin Beta and Epoetin Alfa in Maintenance Phase Hemodialysis Patients, Renal Failure. 33 (3) : 373 - 375 , DOI : 10.3109/0886022X.2011.559675
- MacLeod, J.N. (2001). Clinical Trials of Recombinant Feline EPO Underway. <https://www.cabi.org/agbiotechnet/news/417>
- MacLeod, J.N., Tetreault, J.W., Lorsch, K.A., And Gu, D.N. (1998). Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin. *Am J Vet Res* 59(9):1144–1148. PMID: 9736393
- Mikiciuk, M.G., Polzin, D.J., And Osborne, C.A. (1990). The use of erythropoietin in chronic renal failure. *Adv Small Animal Med Surg.* 3:1–3.
- Miyazaki, Y., Kuryama, K., Higuchi, H., Sohda, H., Imai, N., Saito, M., Kondo, T. And Tomonaga, M, (1997). Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukaemia cell line, AS-E2. *Leukemia*, 11(11): 1941-1949. DOI: 10.1038/sj.leu.2400838
- Oishi, A., Hamada, S., Sakamoto, H., And Shimizu, R. (1995). Preventive effects of recombinant human erythropoietin administration on anemia associated with repeated hemodialysis in nephrectomized dogs. *J Vet Med Sci* 57(5): 989–990. DOI: 10.1292/jvms.57.989
- Peeters, H.R.M., Jongen-Lavrencic, M., Bakker, C.H., Vreugdenhil, G., Breedveld, F.C. And Swaak, A. J. G. (1999). Recombinant human erythropoietin improves health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis and anaemia of chronic disease; utility measures correlate strongly with disease activity measures. *Rheumatol Int.* 18 (5 - 6) : 201 - 20 . <https://doi.org/10.1007/s002960050085>
- Qiu, H., Belanger, A., Yoon, H.P. And Bunn, H.F. (1998). Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *Journal of Biological Chemistry.* 273(18): 11173-11176. doi: 10.1074/jbc.273.18.11173
- Ramakrishnan, R., Cheung, W.K., Farrell, F., Joffe, L., And Jusko, W.J. (2003). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling of Recombinant Human Erythropoietin after Intravenous and Subcutaneous Dose Administration in Cynomolgus Monkeys *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 306 (1): 324-331. DOI: 10.1124/jpet.102.047191.
- Randolph, J.F., Stokol, T., Scarlett, J.M. And MacLeod, J.N. (1999). Comparison of biological activity and safety of recombinant canine erythropoietin with that of recombinant human erythropoietin in clinically normal dogs. *Am J Vet Res.* 60(5):636–642. PMID:10328437
- Randolph, J.F., Scarlett, J., Stokol, T. And MacLeod, J.N. (2004). Clinical Efficacy and Safety of Recombinant Canine Erythropoietin in Dogs with Anemia of Chronic Renal Failure and Dogs with Recombinant Human Erythropoietin - Induced Red Cell Aplasia. *J Vet Intern Med.* 18(1):81–91. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb00139.x>

- Rodrigue, M.E., Brochu, I., orléans-Juste, P.D., Larivière, R., And Lebel, M. (2008). Effect of Erythropoietin on Blood Pressure and on the Vascular Endothelial ET-1/ETB Receptor System. *Am J Hypertens.* 21(6):639-643. doi:10.1038/ajh.2008.37
- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S. And Sasaki, R. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253(1):26–32. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9748
- Sanderson, S. (2005). Use of Erythropoietin and Calcitriol for Chronic Renal Failure in Dogs and Cats. 30th World Congress of The World Small Animal Veterinary association. May 11-14, 2005. Mexico City, Mexico
- Sandhi, A. (2015). The Effect Of Erythropoietin Administration In Experimental Burns Wound Healing: An Animal Study. Thesis. Faculty Of Medicine University Of Indonesia Plastic Reconstructive And Aesthetic Surgery Study Program.
- Shi., X., Yang., J., Zhu, H., Ye, L., Feng, M., Li, J., Huang, H., Tao, Q., Ye, D., Sun, L.H.K., Sun, B.N.C., Sun, C.R.Y., Han, G., Liu, Y., Yao, M., Zhou, P. And Ju, D. (2013). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human EPO-Fc Fusion Protein In Vivo. *PloS ONE* 8(8):e72673. doi:10.1371/journal.pone.0072673
- Skibeli, V., Nissen-Lie, G. And Torjesen, P. (2001). Sugar Profiling Proves that Human Serum Erythropoietin Differs From Recombinant Human Erythropoietin. *Blood.* 98 (13): 3 6 2 6 - 3 6 3 2 . DOI : 10.1182/blood.V98.13.3626
- Storring, P.L., Tiplady, R.J., Gaines Das, R.E., Stenning, B.E., Lamikanra, A., Rafferty, B. And Lee, J. (1998). Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol* 100 (1): 79–89. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1998.00521.x
- Surabattula, R., Sambasiva, K. R. S. And Polavarapu, R. (2011). An optimized process for expression, scale-up and purification of recombinant erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cell culture. *Research in Biotechnology.* 2(3): 58-74
- Tamadon, M.R. And Beladi-Mousavi, S.S. (2013). Erythropoietin; a review on current knowledge and new concepts. *J Renal Inj Prev.* 2 (4) : 1 1 9 - 1 2 1 . DOI : 10.12861/jrip.2013.38
- Toledo, J.R., Sanchez, O., Segui, R.M., Garcia, G., Montanez, M., Zamora, P.A., Rodriguez, M.P. And Cremata, J.A. (2006). High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J. Biotechnol.* 123(2): 225–235. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.10.019
- Wen, D., Boissel, J.P., Tracy, T.E., Gruninger, R.H., Mulcahy, L.S., Czelusniak, J., Goodman, M., And Bunn, H.F. (1993). Erythropoietin Structure-Function Relationships: High Degree Of Sequence Homology Among Mammals. *Blood.* 82 (5):1507-1516. PMID: 8364201
- Yin, H. And Blanchard, K.L. (2000). DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood.* 95(4): 111-119. PMID: 10607693