

## Sıçan midesinde leptin ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi

Immunohistochemical demonstration of leptin expression in the rat stomach

Gülle K<sup>1</sup>

Uyanıkgil Y<sup>2</sup>

Karaöz E<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ISPARTA

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR

<sup>3</sup>Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, KOCAELİ

### Özet

**Giriş:** Leptin, ob gen tarafından kodlanan 16-kDa ağırlığında bir moleküldür. İlk olarak yağ dokusunda tanımlanan leptinin son zamanlarda vücutta çeşitli dokularda da ifade edildiği gözlenmiştir. Çeşitli çalışmalar leptinin midede de fonksiyon gösterebileceğini önermektedir. Bu çalışmada, sıçan mide dokusunda leptinin immunohistokimyasal dağılımını ve ifadesini araştırmak amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada 190-210 gr ağırlığında erkek sıçanlar kullanılmıştır. Işık mikroskopik incelemeler için Wistar albino 5 sıçan anestezi edilmiş ve heparinize edilip fosfat tamponlu % 4 paraformaldehit ile intrakardiyak perfüze edilmiştir. Rutin histolojik takip uygulanan mide dokusu daha sonra 5 µm kalınlıkta kesilip Leptin immunohistokimyasal boyaması yapılmıştır.

**Bulgular:** Midenin fundus bölgesinde leptin (+) boyanan gerek esas hücre, gerekse pariyetal hücre sayısı korpus bölgesine oranla anlamlı derecede artmış bulundu. Korpustaki leptin (+) hücreler kıyaslandığında esas hücre ve pariyetal hücre sayıları arasında anlamlı bir fark saptanmadı; diğer taraftan fundustaki leptin (+) esas hücre sayısının leptin (+) pariyetal hücre sayısından anlamlı şekilde fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca, myenterik pleksusta boyanma gözlemlendi.

**Sonuç:**Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak temel olarak gastrointestinal hareketleri kontrol eden myenterik pleksusta da leptinin varlığı gösterilmektedir. Leptinin sinerjistik etki gösterip beslenmenin düzenlenmesinde kısa süreli regülasyon ve/veya uzun süreli regülasyonda rol oynayabileceği gösterilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Leptin, Obezite, Mide, Sıçan

### Summary

**Introduction:** Leptin is a 16-kDA-protein molecule, expressed by the ob gene. It has first been found in the adipose tissue and several tissues in the body have recently been described to express leptin. Various reports have suggested that leptin can also involve in stomach functions. This study was focused on the expression and distribution of leptin in rat stomach using immunohistochemistry.

**Material and Methods:** The study was conducted on male rats weighing 190–210 g. For light microscopic examination, 5 Wistar albino rats were anaesthetized and perfused transcadiacally with heparinised saline followed by %4 paraformaldehyde in phosphate buffer. Leptin immunohistochemistry was performed on stomach tissues pre-processed for routine histological examination at 5 µm slices.

**Results:** The number of leptin (+) principal cells and parietal cells in the fundus of stomach was significantly higher than the corpus. The comparison of leptin (+) cell number within the corpus revealed no significant difference between the number of principal cells and parietal cells; however statistical analysis within the fundus showed that leptin (+) principal cell number was significantly higher than leptin (+) parietal cell number. Moreover, marked stain was observed in the myenteric plexus.

Yazışma Adresi: Yiğit UYANIKGİL  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim  
Dalı, Bornova-İZMİR  
Makalenin Geliş Tarihi: 19.08.2008 Kabul Tarihi: 26.09.2008

**Conclusion:** Differing from the available studies, data obtained in the current study show that leptin is expressed in the myenteric plexus controlling the gastrointestinal peristalsis. It has been postulated that leptin may participate synergistically in the short- and/or long-term regulation of alimentary functions.

**Key Words:** Leptin, Obesity, Stomach, Rat

## Giriş

Leptin, latince leptos kelimesinden türetilmiş, yağ hücrelerinde ve diğer birçok dokuda ob-gen tarafından üretilen ve plazmaya salınan bir hormondur (1-4). Kana geçtikten sonra özel reseptörleri aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve besin alınımını azaltıp, enerji harcanmasını artırarak etkisini gösterir (4-7). 1994 yılında insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan ve obezite geni olarak adlandırılan (7q31) ob/ob geni'nde kodlanan bir gen ve bu genin ürünü olarak keşfedilen leptin (ob protein), fizyolojik ve genetik mekanizmanın temel faktörü olarak değerlendirilmiştir (8).

Obezite, bugün tüm dünyada yaygın olan bir halk sağlığı problemidir. Obezitenin görülme sıklığı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi boyutlardadır (9). Obezite ile beraber görülme sıklığı artan hastalıkların başında: tip 2 diyabet, kalp damar hastalıkları, yüksek tansiyon, kalp krizi, safra kesesi hastalıkları, kadınlarda hormonal bozukluklar (aşırı tüylenme), eklem hastalıkları, solunum problemleri ve depresyon görülmektedir. Aynı zamanda obezitenin belli kanser tiplerinin (örneğin; meme, endometriyum, prostat ve kolon kanserleri) oluşumunda da önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (9-11). Şişmanlık ideal kilonun üzerinde olmak demektir. İdeal kilo ise, hayatı maksimum uzatan kilo olarak ifade edilir ve vücut ağırlığı indeksi (BMI; Body Mass Index) ile tanımlanır. Şişmanlık vücut ağırlığı indeksinin % 30'dan yüksek olması demektir. Vücut ağırlığı indeksi; vücut ağırlığının kilogram (kg) cinsinden, metrekaresi (m<sup>2</sup>) cinsinden boy uzunluğuna oranıyla hesaplanmaktadır (10).

Leptin öncelikle genetik olarak şişman farelerde inaktif olan ob genetik lokusunun bir ürünü olarak tanımlanmıştır (11). 167 aminoasitten oluşan (21'i salınmadan önce kesilerek atılır) ve 16kD'luk bir protein olan gen ürününe leptin adı verilir. Leptin Yunanca'da ince anlamına gelir (leptos=ince) ve gene sembolü kazandıran da leptindir: fare ve sıçanlarda Lep, insanlarda LEP olarak isimlendirilir (12). Bu peptid adipositler tarafından salınır ve daha düşük seviyelerde gastrik epitelde, plasentada, karaciğerde, kas ve diğer birçok dokuda ifade edilir (11).

Leptin reseptörü (ob-R), ilk defa fare koroid pleksusundan izole edilmiştir. Sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır ve leptine nanomolar düzeyde bağlanır. Ob-R geninin 5 tane izoformu olduğu gösterilmiştir. Ob-Rb (Ob-RI, leptin reseptörünün uzun izoformu olarak da bilinir), sinyal transdüksiyonu için gerekli çeşitli motifleri içeren bir

sitoplazmik bölgeye sahiptir. Diğer formlar bu motiflerin bir kısmını veya hiçbirini bulundurmaz (13).

Leptin beslenme davranışını düzenleyen ve enerji dengesinin kontrolü için kısa ve uzun dönem sistemin bir komponenti olarak bildirilmiştir (14). Besin alınımını kantitatif olarak düzenleyen faktörlerden olan uzun süreli enerji regülasyonu; başlıca vücuttaki enerji depolarının normal miktarının uzun süreli korunması ile ilgilidir. Kısa süreli olan beslenme regülasyonu ise başlıca öğünlerde aşırı yemeyi önlemekle ilgilidir. Kısa süreli regülasyon iki şekilde düzenlenir;

a) Gastrointestinal dolgunluk: Gastrointestinal sistemde özellikle mide ve duodenum gerildiği zaman, inhibitör gerim sinyalleri beslenme merkezini geçici olarak baskılamak için vagus yoluyla taşınır ve böylece besin isteği azalır.

b) Beslenmeyi durduran humoral ve hormonal faktörler: Gastrointestinal hormonlardan kolesistokinin, başlıca yağın duodenuma girmesine yanıt olarak salgılanır ve aşırı yemeyi azaltmak için beslenme merkezleri üzerinde güçlü direkt bir etkiye sahiptir. Besin maddesinin mide ve duodenumda bulunmasının pankreastan önemli miktarlarda glukagon ve insülin salgılanmasına yol açmasının nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte, her iki hormon da beyinde nörojenik beslenme sinyallerini durdurur (15).

Organizmada multifonksiyonel olarak iş gören leptinin midede esas ve parietal hücrelerde ve ilk kez pleksuslarda ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntem ile gösterip literatüre katkıda bulunmak bu çalışmadaki temel amaçtır.

## Gereç ve Yöntem

### Hayvan Bakımı ve Perfüzyon

Bu çalışmada ağırlıkları 190-210 gram arasında değişen, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Ethem Mumcu Hayvan laboratuvarından temin edilen wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı (n=5). Deney süresince hayvanlara optimal şartlarda su ve standart pellet yem verildi. Sıçanlar önce sodyum pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) (Sigma cat:P3761 St Louis, MO, USA) ile derin anestezi altına alındılar. 5000U sodyum heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat, 25.000IU/5 ml), 1ml % 0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriya makasla bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı gözlemlendi. Kalp kontraksiyona devam ederken, bir kanül ile apeks

tarafından sol ventrikül içine girildi. Bu kanül aracılığı ile kan vücuttan tamamen uzaklaşınca kadar sol ventriküle % 0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu verildi. Ardından aynı şekilde, 0.1M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan % 4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu ventrikülden dolaşıma verildi. İntrakardiyak perfüzyon sonrasında tespit edilen doku örnekleri yıkama işleminden sonra rutin histolojik takip olarak bilinen alkol serileri, şeffaflandırma, infiltrasyon ve parafine gömme işlemleri uygulanmıştır.

### İmmünohistokimyasal Protokol

Işık mikroskopik takipten geçmiş parafin bloklardan Leica RM 2145 mikrotom yardımı ile 5 µm kalınlığındaki kesitler polilizinli lamalar (Sigma, St Louis, MO, USA) üzerine alınmıştır. Dehidratasyon aşamasından sonra pH'ı 6 olan sitrat solüsyonu (Carlo Erba, 368057) içinde mikrodalga uygulaması yapıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için % 3'lük hidrojen peroksit (Dako, Glostrup, Denmark) içinde bekletildi. Normal keçi serumu ile bloklama yapıldıktan sonra kesitler primer antikor (Santa Cruz, rabbit poliklonal IgG A-20, Cat; sc-842) ile inkübe edildi. Biotinle işaretlenmiş sekonder antikor (Abcam, Goat anti-rabbit IgG, ab6720, UK) aşamasından sonra streptavidin-HRP kit (Santa Cruz, SC-2053, USA) işlem gören dokular, son olarak % 0.05'lik diaminobenzidin (Zymed Histostain Plus Cat:859643 San Francisco, CA, USA) ile muamele edildi. Boyama işlemi sırasındaki tüm yıkamalar PBS ile yapıldı.

### İstatistiksel analiz

Tüm sıçanlardan (n=5) elde edilen mide preparatlarında fundus ve korpus bölümlerine ait 10 farklı rastgele alanda leptin (+) boyanma gösteren esas ve pariyetal hücreler sayılıp istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arası farkın anlamlılığının test edilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi kullanıldı.  $P < 0.05$  saptandığında post hoc analiz için Bonferroni testi kullanıldı.

### Bulgular

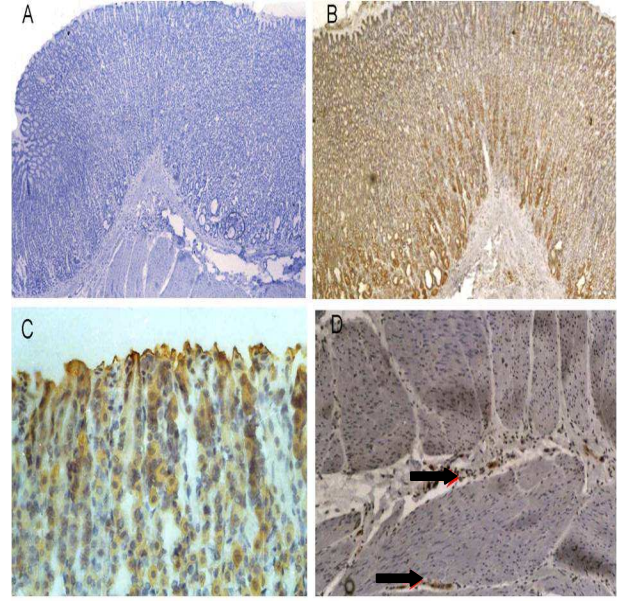
Kontrol boyamada normal rabbit immunoglobulin ve sekonder antikor uygulanmış mide kesiti izlenmektedir. Endojen peroksidaz aktivitesi dışında negatif immün boyanma gözlenmektedir (Şekil 1A).

Midenin fundus bölgesinden geçen kesitlerde özellikle mukoza bölgesinde leptin için orta şiddetten kuvvetliye kadar değişen pozitif immün reaksiyon izlenmektedir (Şekil 1B).

Yüzey epitelinde kuvvetli lineer (membranöz), pariyetal hücre ve esas hücrelerde orta şiddette sitoplazmik, pozitif immün reaksiyon gözlemlendi. Ancak lamina

propriyada herhangi bir boyanma gözlenmemektedir (Şekil 1C).

Sıçan mide duvarından geçen kesitte, iç sirküler ve dış longitudinal düz kas tabakaları arasında bulunan Myenterik (Auerbach) sinir pleksusu leptin (ob protein) için kuvvetli pozitif boyanma gözlenmektedir (Şekil 1D). Tüm bulgular Tablo.1'de özetlenmiştir.



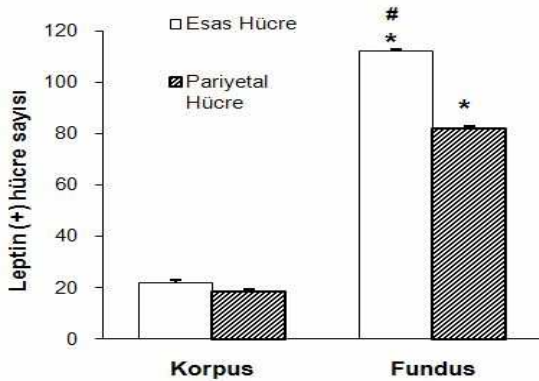
Şekil 1.

- A. Kontrol amacıyla normal rabbit immünooglobulin ve sekonder antikor uygulanmış mide kesitinde negatif boyama izlenmekte (x4).
- B. Leptin (ob- protein) için immün boyama uygulanmış sıçan mide kesitine ait bir görünüm. Özellikle gastrik mukoza bezlerinde şiddetli pozitif reaksiyon gözleniyor (x4).
- C. Mide mukozasından geçen kesitte yüzey epitelinde lineer, pariyetal ve esas hücrelerde ise sitoplazmik boyanma izleniyor (x20).
- D. Sıçan mide duvarından geçen kesitte, iç sirküler ve dış longitudinal düz kas tabakaları arasında bulunan Myenterik (Auerbach) sinir pleksusunun (oklar) leptin için pozitif immün reaksiyon gösterdiği izleniyor (x 120).

Elde edilen verinin istatistiksel analizinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandığında gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı ( $P < 0.0001$ ;  $F(3,39) = 2413$ ). Midenin fundus bölgesinde leptin pozitif boyanan gerek esas hücre, gerekse pariyetal hücre sayısı kardiya bölgesine oranla anlamlı derecede artmış bulundu ( $P < 0.001$ , Şekil 2). Kardiyadaki leptin (+) hücreler kıyaslandığında esas hücre ve pariyetal hücre sayıları arasında anlamlı bir fark saptanmadı; diğer taraftan fundustaki leptin (+) esas hücre sayısının leptin (+) pariyetal hücre sayısından anlamlı bir şekilde fazla olduğu gözlemlendi ( $P < 0.001$ , Şekil 2).

**Tablo 1.** Normal sıçan mide dokusunda histolojik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

İncelenen Bölüm	Reaksiyon şiddeti	Boyama Özelliği
<b>MUKOZA</b>		
• Yüzey epiteli	+++	Lineer
• Lamina Propria	-	
• Pariyetal hücre	+ / ++	Sitoplazmik
• Esas hücre	+ / ++	Sitoplazmik
• Muskularis mukoza	-	
• Gastrik bezler	+++	Sitoplazmik
• Kripta bezleri	+++	Sitoplazmik
<b>SUBMUKOZA</b>		
• Meissner Pleksusu	-	
<b>MUSKULARİS EKSTERNA</b>		
• Myenterik Pleksus	+++	Sitoplazmik
<b>SEROZA</b>		
• Bağ Dokusu Hücreleri	+++	Sitoplazmik



**Şekil 2.** \*  $P < 0.001$ , korpustaki leptin (+) hücre sayısı ile kıyaslandığında

#  $P < 0.001$ , leptin (+) pariyetal hücre sayısı ile kıyaslandığında

## Tartışma

Leptinin biyolojik etkileri arasında; tokluk hissi vermek, adrenal stres hormonlarının üretiminin azaltılmasını sağlamak, metabolik hızı ve seks dürtüsünü arttırmak yer almaktadır. Ayrıca leptin, dişi farelerin puberteye daha çabuk ulaşmasını sağladığı gibi, bir lipostat gibi hareket ederek, vücuttaki yağ seviyelerini düşürmek için gereken davranışları aktive etmektedir. Leptinin sayılan bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için beynin ilgili merkezine ulaşması gerekmektedir ki, bunu koroid pleksusda tanımlanmış bir leptin reseptörü aracılığı ile

yaşamaktadır. Leptin hipotalamusa koroid pleksusda ki reseptörü sayesinde serebrospinal sıvı ile girmektedir. Leptin, beslenmenin azaltılması için hipotalamusta melanokortin-4 reseptörü üzerinde etki göstererek melanokortinlerin üretimine sebep olmaktadır. Böylece bir nörotransmitter stimüle edici rolünde hipotalamusta nöropeptit Y (NPY; appetite stimulating neurotransmitter, iştah stimüle edici nörotransmitter) üretimini baskılar. Bununla beraber leptin tiroid bezinde tiroksin üretiminin artmasına bağlı olarak metabolik hızda artmaya, adrenal bezlerde steroidlerin üretiminin baskılanması ve gonadlarda seks steroidlerinin üretiminin artmasına neden olmaktadır (16, 17).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile leptin ob proteinin adipositler dışında, koroid pleksusda (18), olgun insan oositinde, kumulus ve granuloza hücrelerinde (19), insan plasentasında (20-24), sitotroblastik hücrelerde, sekreteruar endometriyumda (25), mide mukozasında, esas ve pariyetal hücrelerde (26-28), kolonda (29), mide epitel hücrelerinde (26,28), C6 glioblastoma hücrelerinde (30), RT-PCR yöntemiyle beyin ve hipofizde (31), kasda (22), hipofizde (32) histokimyasal ve RT-PCR yöntemleriyle tanımlanmıştır.

Bado ve ark., mide epitelindeki hücrelerin immünoaktif olduğunu bulmuşlardır. Bu alan mide mukozası bezlerinin altında pepsinojen salgılayan esas hücrelerin lokalize olduğu alana benzerlik göstermekte olduğunu ve CCK-8'in intraperitoneal uygulamasından sonra leptin immünoaktivitesinin aniden düştüğünü, buna paralel olarak da mide epitelinde leptin içeriğinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Radioimmünoassay (RIA) çalışmaları sonucunda midedeki leptin miktarının açlıkla hafif bir düşme gösterdiğini rapor etmişlerdir (33).

Breidert ve ark., leptin reseptörünü insan gastrik mukozası hücrelerinde immünohistokimyasal yöntemlerle ekspres etmişlerdir. Leptinin korpusun epitelial bezlerinin alt parçasında immünoaktif olduğunu ve leptinin fonksiyonel tüm izoformlarının mide mukozasında bulunduğunu rapor etmişlerdir (34). Aynı şekilde Ishikawa ve ark., da leptin ve reseptörünün normal ve kanserli gastrik mukozada ifade edildiğini bildirmişlerdir (35). Mix H ve ark., insan mide mukozasında leptin ve reseptörünü immünohistokimyasal yöntemlerle tanımlamışlardır. Leptin ve reseptörünün mRNA'sının, mide mukozası biopsilerinde, kültüre insan mide epitel hücrelerinde ve mide kanser hücrelerinde varlığını rapor etmişlerdir. Ayrıca esas ve pariyetal hücrelerinde leptin ve reseptörü için reaktif olduğunu bildirmişlerdir (26). Son yapılan çalışmalarda Sobhani ve ark., insan normal mide biopsilerinde, leptinin mide bezlerinin altındaki hücrelerin immünoaktif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, pentagastrin veya sekretinin intravenöz infüzyonu dolaşımdaki leptin seviyelerini arttırdığını, buna paralel olarak da mide içeriğine leptin salınımını arttırdığını rapor etmişlerdir (35). Bununla birlikte mide fonksiyonlarının kontrolünden sorumlu olan nöronların direkt olarak leptin tarafından etkilendiği bildirilmiştir (36).

Bu çalışmanın ve diğer araştırmaların sonuçları leptin ve reseptörünün mide dokusunda bulunduğunu ve mide epitel hücrelerin leptin için direkt hedef olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak temel olarak gastrointestinal hareketleri kontrol eden myenterik pleksusda da leptinin varlığı gösterilmektedir. Buna bağlı olarak mide epitel hücre fonksiyonunda leptinin

parakrin ve otokrin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca intestinal 1 hücrelerinin beslenmeye karşı saldığı CCK (kolesistokinin) ile leptinin sinerjistik etki gösterip beslenmenin düzenlenmesinde kısa süreli regülasyon ve/veya uzun süreli regülasyonda rol oynayabileceğini göstermektedir.

## Kaynaklar

1. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, et al. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996;45:1455-62.
2. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. P.Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.
3. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-42.
4. Wilding J, Widdowson P, Williams G. Neurobiology. *British Medical Bulletin* 1997; 53: 286-306.
5. Caro JF. Leptin: From 1958 to the present. *Canadian Journal of Diabetes Care* 1998; 22(1):18-23
6. Prins JB, O'Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clinical Science* 1997; 92: 3-11.
7. Scrocchi LA, Brawn TJ, Drucker DJ. Leptin sensitivity in nonobese glucagon-like peptide I receptor -/- mice. *Diabetes* 1997; 46: 2029-34.
8. Meinders AE, Toornvliet AC, Pijl H. Leptin. *Neth J Med* 1996; 49(6): 247-52.
9. Özer E. Şişmanlık alışkanlık değil hastalıktır. *Diabetle Yaşam* 1999; Mart.
10. Korugan Ü, Güven Ş. Obezite estetik bir sorun değil, hastalıktır. *Literatür* 1999; 62: 1.
11. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in animals. *Nature* 1998; 392, 763-71.
12. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903.
13. Lewandowski K, Horn R, Dunlop D, Medley G. Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(1) :300-306.
14. Barrachina M, Martinez V, Wang L, et al. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Nat Acad Sci* 1997; 94: 10455-10460.
15. Kalra S. Circumventing leptin resistance for weight control. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(8): 4279-4281.
16. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137:3144-3147.
17. Gettys TW, Harkness PJ. The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 1996; 137: 4054-4057.
18. Maness LM, Kastin AJ, Farrell CL, Banks WA. Fate of leptin intracerebroventricular injection into the mouse brain. *Endocrinology* 1998; 139: 4556-62.
19. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, et al. Hypotalamic Orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 1999; 48(11):2132-7.
20. Castellucci M, De Matteis R, Mwisser A, et al. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6 (10): 951-8.
21. Hoggard N, Hunter L, lea Rg, et al. Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr* 2000; 83 (3):317-26.
22. Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH . Dysregulation of the adipoinular axis a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 2001; 170 (2): 323-332.
23. Flier J. Leptin expression and action: New experimental paradigms. *Proc Natl Acad sci* 1997; 94: 4242-4245.

24. Dötsch J, Nüsken KD, Kneer I, et al. Leptin and Neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2755-2758.
25. Gonzales RR, caballero-Compo P, Jasper M, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (12): 4883-4888.
26. Mix H, Widjaja A, Jandl O, et al. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* 2000; 47 (4): 481-6.
27. Burguera B, Couce ME, Long J, et al. The long form of the leptin receptor (ob-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 2000; 71 (3): 187-195.
28. Schneider R, Bornstein SR, Chrousos GP, et al. Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm Metab Res* 2001; 33 (1): 1-6.
29. Hardwick JC, Van den Brink GR, Offerhaus GJ, et al. Leptin is a growth factor for clonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; 121 (1): 79-90.
30. Morash B, Johnstone J, Leopold C, et al. The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165 (1-2): 97-105.
31. Morash B, Li A, Murphy P, et al. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 1999; 140 (12): 5995-8.
32. Jin L, Zhang S, Burguera BG, et al. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000; 141 (1): 333-339.
33. Bado A, Levassaur S, Attoub S, Kermorgant S. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394.
34. Breidert M, Miehke S, Glasow A, et al. Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1999; 34: 954-961.
35. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Expression pattern of leptin and leptin receptor (OB-R) in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(34): 5517-5522.
36. Sobhani I, Bado A, Vissuzine C, et al. Leptin secretion and leptin receptor in human stomach. *Gut* 2000; 47(2): 178-83.