



Koyunlarda Doğum Sonrası Erken Laktasyon Döneminde Leptin ve Ghrelin Seviyelerinin Değişimleri

Duygu UDUM KÜÇÜKŞEN¹✉

1. Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.03.2017	27.04.2017	20.12.2017

Öz: Laktasyon, ruminantlarda enerji metabolizmasında önemli değişimlerin olduğu bir dönemdir. Leptin ve ghrelin enerji homeostazisinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan hormonlardır. Bu çalışmada koyunlarda erken laktasyon döneminde oluşan enerji metabolizması değişimlerinde görev alan leptin ve ghrelin hormon seviyeleri incelendi. Hormon ölçümleri spesifik ticari elisa kitleri kullanılarak belirlendi. Doğumdan sonra 10 koyunun erken laktasyon döneminin 4. ve 6. haftalarındaki plazma leptin ve ghrelin seviyeleri ölçüldü. Leptin ve Ghrelin düzeyleri 4. haftada 6. haftaya göre anlamlı olarak düşük bulunduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Ayrıca 6. haftada bu seviyelerin arttığı gözlemlendi. Ayrıca leptin ve ghrelin seviyeleri arasında yüksek düzeyde anlamlı korelasyon tespit edildi. Bu sonuçlar leptin ve ghrelin peptitlerinin erken laktasyonda meydana gelen enerji değişimlerine cevaben metabolizmada birlikte rol oynadıkları ve eş zamanlı azalıp arttıklarını göstermiştir. Bu durum doğum ve doğum sonrası emzirme ile beraber, artan enerji ihtiyacı, kilo kayıpları ve adipoz dokudaki lipitlerin mobilizasyonu ya da enerji metabolizmasında görev alan başka hormonal düzenleme mekanizmaları ile ilgili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Erken Laktasyon, Ghrelin, Koyun, Leptin.

Changes of Leptin and Ghrelin Levels in the Early Lactation Period After Birth in Sheep

Abstract: Lactation is a period, which involves important changes of energy metabolism in ruminants. Leptin and ghrelin are hormones that play a critical role in the regulation of energy homeostasis. In this study we investigated levels of leptin and ghrelin hormones, which have roles on changes of energy metabolism, during early lactation period in sheep. Leptin and ghrelin levels of 10 sheep after birth were measured at the 4th and 6th weeks of the early lactation period. Hormone measurements were analyzed with using specific commercial ELISA kits. Leptin and Ghrelin levels were significantly lower in the 4th week than in the 6th week ($P<0.05$). There was also a high level of significant correlation between leptin and ghrelin levels. These results have shown that leptin and ghrelin peptides play a role in metabolism in response to energy changes in the early lactation and are simultaneously decreasing or increasing. This may be related to increased energy needs, weight loss, mobilization of adipose tissue lipids, or other hormonal regulatory mechanisms involved in energy metabolism as well as birth and postpartum breastfeeding.

Keywords: Early Lactation, Ghrelin, Leptin, Sheep.

GİRİŞ

Ghrelinin asile edilmiş 28 amino asitten oluşan bir peptittir (1) ve hormonal sekresyon, adipogenezis, kısa dönemli gıda tüketimini artırması, pozitif enerji dengesi oluşturması, gastro-intestinal motilite, hücre proliferasyonu, kemik metabolizması ve reproduksiyon üzerine etkilerinin mevcut olduğu rapor edilmiştir (2). Ghrelinin aynı zamanda rodentlere periferik ya da merkezi olarak verildiğinde vücut ağırlık artışı ve gıda alımını uyardığı, in vitro primer rat hipofiz hücrelerinden GH salınımına da neden olduğu bildirilmiştir (1,3,4,5). Ghrelinin, insan ve rodentlerin midelerinde, sıgırların abomasum ve rumen dokularında oksintik bezler tarafından sentez edildiği bilinmekte (6,7) ve ruminantlarda gıda tüketimi veya enerji dengesinin düzenlenmesinde görev alabileceği öne sürülmektedir (6). Bununla birlikte insan ve rodentlerde çok iyi açıklanmış olan ghrelinin salınımı ve etkisinin ruminantlarda da benzer olup olmadığı hala tartışma konusudur.

Leptin adipoz doku tarafından sentezlenen obez geninin (ob) bir ürünüdür ayrıca gıda tüketimi ve enerji homeostazisinde rol oynar. Ruminantlarda plazma leptin konsantrasyonlarının vücut yağı ile ilişkili olduğu (8), büyüme ve beslenme durumlarından etkilendiği ve istemli gıda tüketimini azalttığı rapor edilmiştir (9,10). Ayrıca ghrelinin, hipotalamik nöropeptit Y/Y1 reseptörünün aktivasyonunu antagonize edebileceği rapor edilmiştir (11). Plazma ghrelin seviyesindeki değişimlerin leptin seviyeleri ile orantılı olduğu bulunmuştur (12). Açlık süresince plazma ghrelin konsantrasyonları artarken leptin konsantrasyonları da eş zamanlı olarak düşmekte, gıda alımı sırasında ise bu durum tersine dönmektedir. Leptin ve ghrelin arasındaki bu zıt etkiler çok iyi analiz edilmiş ve leptinin dolaşımdaki ghrelin seviyeleri üzerinde bir etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür. Bunun yanı sıra ghrelinin kronik olarak verilmesi sonucunda adipoziteyi uyarak vücut ağırlığını artırdığı ve enerji

harcanması, yağ yıkımı ve lipolizisi azalttığı gözlenmiştir (13).

Laktasyon sırasında anneden yavruya, hayatta kalması için gerekli olan önemli miktardaki enerji aktarılır. Laktasyonun başlamasıyla, meme bezinin de eklenen metabolik aktiviteleri toplam enerji gereksinimlerini yaklaşık dört kat artırmaktadır. Gebelikten laktasyona geçiş sürecinde vücutta metabolizmayı düzenleyici komplekste ve enerji dengesinin dinamik değişimlerinde leptin ve ghrelin peptitlerinin rolüne ait çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ayrıca insan ve rodentlere göre daha çok enerji açığa çıkan çiftlik hayvanlarında, doğumdan sonra artmış enerji metabolizmasında görev alan bu metabolik hormonlara ait ulaşılabilir bilgi çok azdır.

Bu çalışmada erken laktasyondaki koyunlarda plazma leptin ve ghrelin konsantrasyonları belirlenerek, enerji homeostazisinde görev alan bu hormonlar ve doğum sonrası düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırma materyalini 2. ve 3. doğumlarını gerçekleştirmiş, toplam 10 baş Kıvırcık ırkı koyun oluşturmuştur. Çalışma Bursa'daki ticari bir koyun yetiştiricisinin sürüsünde gerçekleştirilmiş ve koyunlar doğurdukları tarihe göre kaydedilerek aynı tarihte doğuranlar çalışmaya alınmıştır. Koyunların doğum ağırlığı ortalaması 2.86 kg'dır. Çalışma boyunca su ve yulaf kuru otu koyunlara ad-libitum olarak verilmiştir ve günlük olarak hayvan başına 500 g konsantre yem (koyun süt yemi) sunulmuştur. Koyunlara verilen süt yeminin besin maddesi içeriği Tablo 1'de belirtilmiştir. Doğumu takiben ilk bir hafta koyunlar meraya çıkartılmamış ve kuzular annelerinin yanında kalmışlardır. Doğumu takiben bir hafta sonrasında koyunlar sabah meraya çıkartılıp ortalama günde 6 saat merada kaldıktan sonra ertesi gün tekrar meraya çıkana kadar yavruları ile beraber barındırılmışlardır. Çalışmanın deneysel kısmında

koyunların hormon seviyelerini tespit etmek üzere belirlenen koyunlardan, doğum sonrası 4. ve 6. haftalarda birer kez olmak üzere toplam 2 kez vena jugularisden heparinli tüplere kan alınmıştır. Analizler, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Alınan kan örnekleri soğuk zincir koşullarında kısa süre içerisinde laboratuvara taşınarak 3000 rpm'de 10 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Oluşan plazma numuneleri -20°C'de analiz gününe kadar depolanmıştır. Analiz gününde plazma örnekleri ghrelin ve leptin konsantrasyonları belirlenmek amacıyla koyun spesifik ticari elisa kitleri kullanılmıştır (Eastbiopharm Sheep Ghrelin Elisa kit CK-E90718 ve Eastbiopharm Sheep Leptin Elisa kit CK-E90719). Laboratuvarda plazma numuneleri kit prosedürü doğrultusunda çalışılarak Biotek Epoch marka plate reader ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2013-09/03 karar numarası ile etik kurulu onaylanmıştır.

Tablo 1. Koyun süt yeminin besin maddesi içeriği¹

Table 1. Nutrient content of sheep milk diet¹

Besin maddesi	Koyun süt yemi (pelet formunda) ^{2,3}
Kuru madde, %	90.25
Ham protein, (% 100 KM ⁴)	18.22
Ham yağ, (% 100 KM ⁴)	4.08
Ham selüloz, (% 100 KM ⁴)	9.82
Ham kül, (% 100 KM ⁴)	9.49

¹ Yemin besin maddesi analizleri AOAC (1990)'da belirtilen yöntemlere göre yapılmıştır. ² ProYem, Koyun Süt Yemi, Matlı Yem Fabrikası, Karacabey/TÜRKİYE. ³ Koyun süt yemi karomasında kullanılan hammaddeler: mısır, buğday kepeği, arpa, mısır gluten yemi, ayçiçeği tohumu küspesi, soya fasulyesi küspesi, melas, soya yağı, mineral-vitamin premiksi, kireç taşı, tuz. ⁴ Kuru madde.

İstatistiksel Analiz

Hormonal verilerin karşılaştırılmasında Paired Sample t-test kullanılmış, Korelasyon analizleri için Pearson Korelasyon tercih edilerek önemlilik testi ise çift yönlü olarak yapılmıştır.

Önemlilik düzeyi P<0.05 olarak alınmıştır. Tüm istatistik analizler SPSS (Version 20.0) programından yararlanılarak yapılmıştır (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

BULGULAR

Doğumdan sonra 4. hafta plazma ghrelin konsantrasyonları 6. haftaya göre daha düşük seviyede seyrettiği, yine plazma leptin konsantrasyonlarının da aynı şekilde 4. haftada 6. haftaya göre daha düşük seviyede seyrettiği gözlenmiştir (Tablo 2). Bununla birlikte Kıvırcık ırkı koyunların ghrelin ve leptin hormonlarının haftalara göre ortalama seviyeleri istatistiki yönden önemli olmadığı saptanmıştır (P<0.47 ve P<0.22 sırasıyla). Ghrelin ve leptinin 4. ve 6. haftaya ait konsantrasyonları arasındaki korelasyon katsayıları pozitif (r=0.99) ve önemli bulunmuştur (Tablo 3) (P<0.01).

Tablo 2. Koyunlarda erken laktasyon döneminde leptin ve ghrelin hormonlarının haftalık ortalama seviyeleri

Table 2. Weekly average levels of leptin and ghrelin hormones in the early lactation period in sheep.

Hormon	Zaman (hafta)	Ortalama \pm S.H.	P
Ghrelin G	4	224.12 \pm 95.49	0.47
	6	287.90 \pm 100.57	
Leptin Lep 4 Lep 6	4	2.15 \pm 0.93	0.22
	6	3.48 \pm 1.13	

Tablo 3. Koyunlarda erken laktasyon döneminde leptin ve ghrelin hormonlarının haftalık korelasyon analizi.
Table 3. Weekly correlation analysis of leptin and ghrelin hormones in early lactation period in sheep.

Hormon		Lep 4	Gre 6	Lep 6	Doğum Ağırlığı
Gre 4	r	0.99	0.64	0.58	-0.62
	P	<0.01	0.12	0.17	0.14
Lep 4	r		0.62	0.57	-0.66
	P		0.13	0.18	0.11
Gre 6	r			0.99	-0.04
	P			<0.01	0.93
Lep 6	r				0.01
	P				0.98

Gre 4: 4. Hafta Ghrelin düzeyi, Gre 6: 6. Hafta Ghrelin düzeyi, Lep 4: 4. Hafta Leptin düzeyi, Lep 6: 6. Hafta Leptin düzeyi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Laktasyon ve meme bezinin metabolik aktiviteleri toplam enerji gereksinimlerini önemli düzeyde arttırmaktadır. Özellikle laktasyonun erken döneminde istemli yem tüketimi ile artan enerji harcamalarını karşılamak mümkün olmaz ve önemli bir enerji açığı gelişir. Bu enerji açığı beyaz yağ dokusundan lipidlerin mobilize edilmesi ile karşılanmaktadır (14,15,16). Gebelik ve laktasyon, hormonal değişikliklerle karakterize edilen fizyolojik durumlardır. Buna ilaveten, enerji homeostazisinde önemli rol oynayan leptin ve ghrelin gibi hormonların kandaki konsantrasyonları günlük, mevsimsel ve metabolik durumlarına göre değişimler göstermektedir. Çalışmada laktasyon döneminde de gerçekleşen enerji açığından bu hormonların plazma seviyelerinin ne düzeyde etkilendiği incelendi.

Çalışmada süt veriminin yükseldiği laktasyonun 4. haftasında leptin ve ghrelin seviyeleri düşük düzeyde seyrettiği oysa erken laktasyonun bitmesine yakın dönem olan 6. haftada bu hormonların plazma seviyelerinin biraz daha arttığı gözlenmektedir. Laktasyon döneminde süt üretiminin bir sonucu olarak, birtakım metabolik sinyaller tarafından yansıtılan enerji dengesinde bir değişiklik oluşmaktadır, tiroid hormonu seviyelerindeki düşüşler buna en güzel örnektir (17). Aslında artan enerji ihtiyacını karşılamak için laktasyonda gıda alımı

birkaç kat artmaktadır (18). Bununla birlikte gıda alımını önemli bir şekilde arttıran ghrelin, çalışmamızda erken laktasyon döneminde plazma seviyelerinde düşük seyirler göstermiştir. Shibata ve ark. (19), ratlarda gebelik ve laktasyon süresince plazma ghrelin konsantrasyonlarının önemli bir şekilde düştüğünü öne sürmüşlerdir ve bu çalışmamızda elde edilen bulgularımızla uygunluk göstermektedir. Ghrelinin dolaşımdaki seviyeleri laktasyondaki gıda alımı artışına paralel seyir göstermemesi, laktasyonda değişen enerji dengeleri ve metabolizmada kısmen bağımsız birkaç mekanizmayı kapsayabilir. Başka endojen ligandların veya muhtemelen çapraz reaksiyona giren diğer hormonların dolaşımdaki konsantrasyonu ghrelinin plazma seviyelerini etkileyebileceği rapor edilmiştir (20). Buna en güzel örnek; ghrelinin büyüme hormonu salgılatıcı etkisiyle beraber, ekzojen büyüme hormonu verilmesi, midedeki ghrelin mRNA ekspresyonunu ve plazma ghrelin düzeyini düşürdüğü görülmüştür (21). Yine başka bir çalışmada, ratlarda laktasyon süresince dolaşım ghrelin seviyelerinde bir değişiklik görülmemiş ve dolaşım büyüme hormonu üzerine ghrelinin bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (19). Büyüme hormonunun erken laktasyon döneminde artması göz önüne alındığında (22); hipofiz büyüme hormonu, midedeki ghrelin üretimi üzerine bir feed-back düzenleme göstermekte ve ghrelin seviyelerini hipotalamik

olarak negatif etkilemektedir. Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, çalışmamızda erken laktasyonda dolaşım ghrelin seviyelerinin etkilenmemesi hormonların birbirleri üzerine olan etkileri sonucu oluşabilir. Çalışmada plazma leptin konsantrasyonlarının ghreline benzer şekilde laktasyonun 4. haftasında 6. haftaya göre daha düşük düzeylerde seyrettiği gözlenmiştir. Rodent ve insanlarda bildirildiği gibi (23,24,25,26) süt sığırlarında da (27) gebelikten erken laktasyona geçişte plazma leptin konsantrasyonlarında bir düşme görülmüştür. Deney türleri ve stratejilerinin farklı olmasına rağmen leptin düzeylerinde elde edilen bu benzer düşmeler, erken laktasyonun enerji ihtiyacını karşılama amacıyla açıklanabilir. Leptin, yem alımının ve enerji düzenlenmesindeki rolü nedeniyle, gebelikten laktasyona geçiş sırasında metabolizmanın koordinasyonuna katılabilir (27). Block ve ark. (27) süt ineklerinde yaptıkları çalışmada doğum ve laktasyonun 3. haftasında enerji ihtiyacının yaklaşık %33'ünü endojen lipit mobilizasyonu ile sağlandığını bildirmişlerdir. Buna göre adipoz dokudan salgılanan leptinin, doğum sonrası erken laktasyonda dolaşımdaki seviyesinin düşmesi, lipit mobilizasyonu sonucu adipoz doku kitlesinin azalması ile ilişkilendirilebilir.

Aydın ve ark. (28), laktasyon dönemindeki insanlarda yaptıkları çalışmada doğumdan sonra ghrelin seviyelerinin dereceli olarak arttığını ve bu dereceli artışın annenin doğum sonrası kilo kaybı ile bağlantılı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da doğumdan sonra koyun plazma ghrelin seviyelerinin dereceli olarak arttığını tespit ettik. Doğumdan sonra zamanla oluşan kilo kayıpları ve ghrelin peptidin kilo kayıplarına cevaben dolaşım seviyelerinin dereceli artışını açıklamaktadır. Doğum sonrası süt ineklerinde plazma leptin düzeylerinde meydana gelen değişimlerin çoğu beslenme ve adipozite arasındaki etkileşimi göstermektedir. Süt ineklerinde yapılan bir çalışmada leptin ve diğer metabolik hormonlar arasında önemli bir korelasyon elde edilmiş ve bu yüksek korelasyonun enerji dengesindeki eşzamanlı

düzenlemeyi temsil edebileceği öne sürülmüştür (27). Bizim çalışmamızda da aynı şekilde doğum sonrası erken laktasyondaki koyunların plazma ghrelin ve leptin seviyelerine ait anlamlı korelasyonlar, bu iki önemli metabolik hormonun enerji homeostazisinde birlikte çalıştığını göstermektedir. Bunun yanı sıra çalışmamızda bir takım kısıtlamaların olduğuna ve özellikle materyal sayısının az olduğuna da dikkat edilmelidir. Ayrıca ruminantlarda doğum sonrası anne plazmasındaki leptin ve ghrelin seviyelerine ait araştırmaların az bulunması diğer çalışmalarla karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır. Laktasyondaki koyunlarda ghrelin ve leptin hormon düzeylerinin tespiti önemli olmakla beraber bu çalışmaya ek olarak yavruların plazmasında ve anne sütündeki bu hormon seviyelerinin analizinin yapılmasına ve süt verimi, canlı ağırlık, kuzulardaki süt tüketimi gibi parametrelerin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, çalışmada ghrelin ve leptin peptitlerinin plazma konsantrasyonlarının erken laktasyonda süt veriminin en yoğun olduğu 4. haftaya göre erken laktasyonun bitmesine yakın dönem olan 6. haftada daha yüksek olması, bu durumun annenin doğum ve doğum sonrası emzirme ile beraber oluşan kilo kayıpları ve adipoz dokudaki lipitlerin mobilizasyonu ya da enerji metabolizmasında görev alan başka hormonal mekanizmaların işe karışması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte ghrelin ve leptin peptitleri arasındaki yüksek korelasyon koyunlarda erken laktasyonda oluşan enerji eksikliğine cevaben enerji homeostazisinde bu iki önemli metabolik peptidin birlikte görev aldıklarını göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, KUAP (V)-2013/78 numaralı Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri desteği ile yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 656-660.
2. Zizzari P., Hassouna R., Grouselle D., Epelbaum J., Tolle V., 2011. Physiological roles of preproghrelin-derived peptides in GH secretion and feeding. *Peptides*, 32, 2274-2282.
3. Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409, 194-198.
4. Tschöp M., Smiley DL., Heiman ML., 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407, 908-913.
5. Cummings DE., Shannon MH., 2003. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg*, 138, 389-396.
6. Hayashida T., Murakami K., Mogi K., Nishihara M., Nakazato M., Mondal MS., Horii Y., Kojima M., Kangawa K., Murakami N., 2001. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol*, 21, 17-24.
7. Gentry PC., Willey JP., Collier RJ., 2003 Ghrelin, a growth hormone secretagogue, is expressed by bovine rumen. *J Anim Sci*, 81, 123.
8. Delavaud C., Ferlay A., Faulconnier Y., Bocquier F., Kann G., Chilliard Y., 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci*, 80, 1317-1328.
9. Tokuda T., Kimura D., Fujihara T., 2001. The relationships between leptin and insulin in blood plasma of growing lambs. *Anim Sci*, 73, 71-76.
10. Tokuda T., Delavaud C., Chilliard Y., 2002. Effect of dietary energy levels on plasma leptin in sheep. *Anim Sci J*, 73, 471-478.
11. Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayash T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K., Nakao K., 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 50, 227-232.
12. Cummings DE., Foster KE., 2003 Ghrelin-leptin tango in body-weight regulation. *Gastroenterology*, 124, 1532-1535.
13. Ukkola O., 2003. Ghrelin and insulin metabolism. *Eur J Clin Invest*, 33, 183-185.
14. Bauman DE., Currie WB., 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*, 63, 1514-1529.
15. Bell AW., 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci*, 73, 2804-2819.
16. Barber MC., Clegg RA., Travers MT., Vernon RG., 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim Biophys Acta*, 1347, 101-126.
17. Van Haasteren GA., Van Toor H., Klootwijk W., Handler B., Linkels E., Van der Schoot P., 1996. Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotrophin secretion during lactation. *J Endocrinol*, 148, 325-336.
18. Ota K., Yokoyama A., 1967. Body weight and food consumption of lactating rats: effects of ovariectomy and of arrest and resumption of suckling. *J Endocrinol*, 38, 251-61.
19. Shibata K., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Makino Y., Makino I., Kawarabayashi T., Futagami K., Gomita Y., 2004. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides* 25, 279-287.
20. Kojima M., Kangawa K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 85, 495-522.
21. Vasilatos R., Wangsness PJ., 1981. Diurnal variations in plasma, insulin and growth hormone associated with two stages of lactation in high producing dairy cows. *Endocrinology*, 108, 300-304.
22. Kawai M., Yamaguchi M., Murakami T., Shima K., Murata Y., Kishi K., 1997. The placenta is not the

- main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Com*, 240, 798-802.
23. Brogan RS., Mitchell SE., Trayhurn P., Smith MS., 1999. Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production. *Endocrinology*, 40, 2621-2627.
24. Woodside B., Abizaid A., Walker C., 2000. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm and Behav*, 37, 353-365.
25. Block SS., Butler WR., Ehrhardt RA., 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J Endocrinol*, 171, 339-348.
26. Aydin S., Ozkan Y., Erman F., Gurates B., Kilic N., Colak R., Gundoga T., Catak Z., Bozkurt M., Akin O., Sen Y., Sahn I., 2008. Presence of obestatin in breast milk: Relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women. *Nutrition*, 24, 689-693.