

SIÇANLARDA GRELİN UYGULAMASININ BAZI HEMATOLOJİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ*
Effect of Ghrelin Administration on Some Hematological Parameters in Rats

Naciye NARİN¹, Ebru ÇETİN²

Özet : Bu çalışma sıçanlarda grelin uygulamasının bazı hematolojik parametreler üzerine etkisini incelemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla 40 erkek Sprague Dawley ırkı sıçan eşit şekilde 2 gruba ayrılarak kontrol grubuna deri altı yolla 5 gün süreyle %0.9 NaCl, deney grubuna ise deri altı yolla 5 gün süreyle günde 10 nmol/kg dozunda grelin uygulandı. Uygulamalardan 24 saat sonra gruplardan kan örnekleri alınarak total lökosit ve eritrosit sayısı, hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değeri, ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobini ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonları ile lökosit alt tipleri belirlendi. Deney grubunda, grelin uygulamasına bağlı olarak lenfosit oranında anlamlı bir artma ($p<0.05$) gözlenirken nötrofil oranında ise önemli bir azalma ($p<0.05$) tespit edildi. Diğer yandan kontrol ve deney grubundaki hayvanların total eritrosit ve lökosit sayısı ile hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değeri, ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobini, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu ve diğer lökosit alt tiplerinin (monosit, eozinofil ve bazofil) grelin uygulamasından etkilenmediği belirlendi. Sonuç olarak, sıçanlara uygulanan grelinin lenfopoezisi uyarmak suretiyle lenfosit oranını artırabileceği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Sıçan, grelin, hematolojik parametre

Summary: This study was carried out to determine the influence of ghrelin administration on some haematologic parameters in rats. Forty male Sprague Dawley rats were equally divided into two groups, control group (1 ml physiological saline s.c., for 5 days) and experimental group (ghrelin, s.c., 10 nmol/kg/day, for 5 days). From each animal, blood samples were taken 24 h after the end of treatment, and some hematological parameters were evaluated: total erythrocyte and leukocyte count, hemoglobin concentration, hematocrit value, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration and mean corpuscular volume, and leukocyte differential counts. Lymphocyte percentage was increased ($p<0.05$), while neutrophil percentage was decreased ($p<0.05$) due to ghrelin administration. On the other hand, total erythrocyte and leukocyte count, hemoglobin concentration, hematocrit value, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration, mean corpuscular volume, and other differential leucocyte counts (monocytes, eosinophils, and basophils) were not affected by ghrelin administration. As a result, it was determined that ghrelin administration to rats may increase lymphocyte ratio by stimulating lymphopoiesis.

Keywords: Rat, ghrelin, hematologic parameter

¹ Bilim Uz.Erciyes Ün, Vet.Fizyoloji AD, Kayseri

² Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün, Veteriner Fak.Fizyoloji AD,Kayseri

Geliş Tarihi : 21.10.2010 Kabul Tarihi : 13.12.2010

*Bu çalışma aynı adlı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

Grelın, 1999 yılında Japon bilim adamları tarafından keşfedilmiştir. Temel olarak mide fundusundan salınan 28 amino asit içeren lipopeptid yapıda bir hormondur (1). Bu hormon mideden başka hipotalamus, hipofiz, tükürük bezi, tiroid bezi, ince bağırsak, böbrek, kalp, pankreasın alfa hücreleri ve gonadlarda da sentezlenmektedir (2,3).

Açlık halinde grelin kanda yüksek miktarlarda bulunmakta olup, yemek yeme ile miktarı azalmaktadır. Grelın yemek yemeyi, besin kullanımını, enerji kullanımını ve iştahı düzenlemektedir. Eksojen grelin farelerde besin alımını artırmakta, yağ kullanımını azaltmakta ve sonuçta yağ dokusu artışına neden olmaktadır (4). Grelın midede üretildikten sonra ön hipofiz ve hipotalamik bölgedeki reseptörlerine ulaşır büyüme hormonu salınımını uyarır ve enerji homeostazını düzenler (5).

Grelın iştah, pozitif enerji dengesi, hipotalamus ve üreme fonksiyonları, uyku, davranış, mide, pankreas ve kardiyovasküler sistem fonksiyonları üzerinde etkilidir. Bu etkilerinden dolayı grelinin, gastroenteroloji, immunoloji, onkoloji ve kardiyoloji gibi bilim dallarında kullanımıyla ilgili birçok araştırma yapılmaktadır (2, 6-8).

Eksojen grelin uygulamasının kan parametreleri üzerine doğrudan etkisi ile ilgili verilere literatürde rastlanılamamıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular; grelin hormonunun bazı hematolojik parametreler üzerine olası etkilerini ortaya koyacak ve grelin hormonunun işlevleri hakkında yeni bilgiler sağlayacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada hayvan materyali olarak, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen 40 adet, sağlıklı, ortalama 300 gram ağırlığında erkek Sprague-Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Bu sıçanların 20 tanesi deneme grubunu, diğer 20 tanesi ise kontrol grubunu oluşturdu.

Kontrol grubuna 5 gün süreyle % 0.9'luk NaCl deri altı yolla, deneme grubuna 10 nmol/kg/gün grelin 5 gün süreyle deri altı yolla uygulandı. Kontrol ve deneme gruplarından son enjeksiyondan 24 saat sonra kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinde eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri, ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobini ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, lökosit sayısı ile lökosit alt tipleri belirlendi.

Heparinli tüplere alınan kan numunelerinde total eritrosit sayısı ile lökosit sayısı ışık mikroskobu altında Thoma lamı kullanılarak belirlendi. Hemoglobin miktarı Sahli Yöntemine göre, hematokrit değeri ise kapillar tüplere kan çekildikten sonra mikrohematokrit santrifüjünde santrifüj edilerek tespit edildi. Lökosit formülü için sürme kan frotileri hazırlanarak May Grünwald-Giemsa boyaması yapıldıktan sonra lökosit alt tipleri belirlendi (9). Eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı ve hematokrit değerleri kullanılarak ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobini ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu hesaplandı (10).

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS 12.0 for Windows paket programında gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek amacıyla student-t testi kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama ve standart hata olarak verildi. Önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol ve grelin verilen gruptan alınan kan örneklerinden elde edilen eritrosit sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri ile ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobini ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonuna ait değerler Tablo I'de gösterildi.

Kontrol ve grelin grubu eritrosit sayısı, hemoglobin

Tablo I. Kontrol ve Grelın grubu sıçanların eritrosit sayıları, hemoglobın miktarları, hematokrit değerleri, ortalama eritrosit hacimleri, ortalama eritrosit hemoglobınları ve ortalama eritrosit hemoglobın konsantrasyonları

Parametreler	Kontrol Grubu	Grelın Grubu	p değeri
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Eritrosit ($\times 10^6$)	7.81 \pm 1.83	7.36 \pm 1.84	0.210
Hemoglobın (g /dl)	14.87 \pm 0.58	15.52 \pm 0.56	0.431
Hematokrit (%)	40.80 \pm 1.40	43.50 \pm 1.00	0.137
OAH (μm^3)	52.24 \pm 1.75	59.10 \pm 1.92	0.213
OAHb (μg)	18.97 \pm 0.32	21.05 \pm 0.43	0.189
OAHbK (%)	36.44 \pm 0.92	35.67 \pm 0.75	0.126

OAH: Ortalama eritrosit hacmi; OAHb: Ortalama eritrosit hemoglobını; OAHbK: ortalama eritrosit hemoglobın konsantrasyonu

miktari, hematokrit değeri ile ortalama eritrosit hacmi, ortalama eritrosit hemoglobını ve ortalama eritrosit hemoglobın konsantrasyonu açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p > 0.05$) gözlenmedi.

Kontrol ve grelin verilen gruptan alınan kan örneklerinden elde edilen lökosit sayısı ve lökosit formülüne ait değerler Tablo II’de gösterildi.

Grelın uygulanan grupta lenfosit oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$) bulunurken, nötrofil oranının ise grelin grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede düşük ($p < 0.05$) olduğu belirlendi. Öte yandan, kontrol ve grelin grubu arasında lökosit sayısı ile monosit, eozinofil ve bazofil yüzde oranları açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p > 0.05$) tespit edilemedi.

Tablo II. Kontrol ve Grelın grubu sıçanların lökosit sayıları ve lökosit alt tipleri

Parametreler	Kontrol Grubu	Grelın Grubu	p değeri
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Lökosit ($\times 10^3$)	7.86 \pm 8.49	7.30 \pm 5.32	0.289
Lenfosit (%)	71.28 \pm 1.25 ^a	79.56 \pm 1.72 ^b	0.017
Nötrofil (%)	23.11 \pm 1.24 ^a	14.44 \pm 1.78 ^b	0.015
Monosit (%)	5.06 \pm 0.39	4.78 \pm 0.61	0.708
Eozinofil (%)	0.75 \pm 0.19	0.73 \pm 0.21	0.779
Bazofil (%)	0.20 \pm 0.10	0.10 \pm 0.10	0.186

a,b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık önemlidir ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Hekimlikte klinik bulguları tamamlayan ve güçlendiren incelemeler arasında hematolojik analizlerin ayrı bir önemi vardır. Bu analizler hastalığın teşhisi, patogenezi ve prognozu hakkında hekime önemli bilgiler verir. Hayvanlarda hematolojik parametreler ırk, yaş, bölge, cinsiyet ve beslenme gibi faktörler ile çeşitli hastalıklar ve ilaç uygulamalarından etkilenmektedir (10-13). Kan hücreleri yapımında birçok hormonun rol oynadığı bilinmektedir (14,15).

Grelinin hematolojik parametreler üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada grelin uygulamasından etkilenen en önemli hematolojik parametrelerin lenfosit ve nötrofiller olduğu tespit edildi. Çalışmada 5 gün süreyle deri altı yolla 10 nmol/kg dozda sıçanlara verilen grelinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında lenfosit oranında istatistiksel olarak önemli derecede bir artma ($p<0.05$) oluşturduğu saptandı. Grelinin lenfosit sayısı üzerine doğrudan etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamakla birlikte lenfositler tarafından grelin ve büyüme hormonu salındığının tespit edilmesi (16) ve grelin tarafından salınımı artırılan büyüme hormonunun lenfopoezisi uyardığı yönündeki bildirimler (17) bulgularımızı desteklemektedir. Benzer şekilde Dixit ve ark. grelinin farelerde timopoezisi uyardığını ve timüsün boyutunu artırdığını göstermişlerdir (18). Grelinin büyüme hormonu ve IGF-I salınımını uyarıcı etkisi göz önünde bulundurulduğunda kan hücreleri üzerine olası etkisini büyüme hormonu veya IGF-I aracılığı ile gerçekleştirebileceği düşünülebilir. Büyüme hormonu gibi çeşitli hormon uygulamalarının da kan hücreleri üzerine etki yaptıkları bildirilmektedir (19). Grelinin en önemli fonksiyonlarından biri hipofizden büyüme hormonu salınımını uyarmasıdır. Hattori, grelinin kan hücreleri üzerine etkisini doğrudan ya da büyüme hormonu veya IGF aracılığı ile gösterebileceğini ileri sürmüştür. Aynı araştırmacı lenfosit ve nötrofillerin büyüme hormonu ve grelin hormonu reseptörü taşıdığını saptamış ve bu reseptörlerin varlığının grelin ve büyüme hormonlarının lenfositler üzerine etkisini gösteren bir kanıt olabileceğini vurgulamıştır (20). Uzun süre eşeklere verilen büyüme hormonunun T

lenfosit sayısını artırması bulgularımız ile paralellik göstermektedir (21). Eksojen büyüme hormonu uygulamasının B lenfositlerden IgG üretimini artırdığının saptanması da (22) grelinin lenfosit sayısını artırabileceğini akla getirmektedir. Bazı araştırmalarda büyüme hormonu ve grelinin hematopoietik kök hücrelerinin miyeloid hücrelere dönüşümünde rol oynadığı bildirilmiştir (23,24). İnsanlarda ülseratif kolit ve Crohn's hastalığı gibi bazı immunolojik bozukluklarda, omuriliğin kronik yangısı ile karakterize ankiloz spondilitli hastalarda serum grelin düzeyinin arttığı tespit edilmiştir (25,26). Yangının akut evresinde nötrofillerin, kronik evresinde ise lenfositlerin arttığı bilinmektedir (10). Kronik evrede gözlenen lenfosit sayısındaki bu artmanın nedeni lenfositlerden salınan grelin hormonu pozitif geri-bildirim etkisinden kaynaklanabilir.

Çalışmada total lökosit sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmazken nötrofil sayısında tespit edilen azalma, grelinin etkisiyle lenfositlerde gözlenen artışın nötrofillerde oluşturduğu göreceli bir azalmaya bağlanabilir. Literatürde grelinin nötrofil sayısı üzerine doğrudan etkisi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmadı. Öte yandan, grelinin lökositlerin fagositik aktivitesi üzerine etkileri konusunda yapılan çalışmalarda çelişkili bulgular bildirilmiştir. Yada ve ark. grelinin balıklarda fagositik aktiviteyi artırdığını (27) bildirirken Tümer ve ark. ise soğuk stresine maruz bırakılan ratlarda peritoneal makrofajların fagositik aktivitelerini azalttığını ileri sürmüşlerdir (28). Anılan araştırmacılar grelinin fagositik aktivite üzerine lökositlerden salınan büyüme hormonu aracılığı ile etki yapabileceğini vurgulamışlardır. Bazı çalışmalarda büyüme hormonu tarafından granülositlerin fonksiyonu ve gelişmesininin uyarıldığı bildirilirken (29,30) bazı araştırmalarda ise büyüme hormonunun granülopoezi uyarmadığı ileri sürülmektedir (31). Monosit, nötrofil ve monositlerde büyüme hormonu reseptörlerinin bulunması (32) nedeniyle büyüme hormonu verilmesinin hem granülosit-koloni uyarıcı faktör hemde nötrofil sayısı üzerine artırıcı etki göstermesi beklenebilir. Nitekim Somhiya ve ark büyüme hormonu yetersizliği olan hastalara eksojen verilen rekombinant büyüme hormonunun granülosit koloni uyarıcı faktör ve lökosit sayısını artırdığını sapta-

mişlardır (33). Benzer şekilde, *in vitro* ortamda yapılan bazı çalışmalarda IGF-I gibi büyüme hormonunun da lökemik hücre çoğalmasını artırdığı tespit edilmiştir (19). Yukarıdaki bulgulardan farklı olarak çalışmamızda nötrofil oranında anlamlı bir artışın gözlenmemesi canlı türünün farklılığına, verilen doza veya uygulama süresine bağlı olabilir.

Çalışmada grelin grubu sıçanların eritrosit sayıları, hemoglobin miktarları, hematokrit değerleri, ortalama eritrosit hacimleri, ortalama eritrosit hemoglobinleri ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik saptanamadı. Literatürde grelinin eritrosit sayısı ve indeksi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmadığı için bu parametrelerle ilgili karşılaştırma yapılmadı. *In vitro* ortamda yapılan bazı çalışmalarda IGF-I gibi büyüme hormonunun eritrosit üretimini artırdığı tespit edilmiştir (19). Öte yandan Vicini ve ark. gebe ineklere verilen büyüme hormonunun eritrosit sayısında ve hematokrit değerinde azalma oluşturduğunu bildirmişlerdir (34). Benzer şekilde demir eksikliği olan sığırlara uygulanan rekombinant büyüme hormonunun normale göre daha az olan eritrosit sayısını daha da azalttığı bildirilmiştir (35). Sağın yapılan ineklere eksojen büyüme hormonu verildiğinde, eritrosit ile ilgili birçok parametrelerde hafif bir azalma gözlemlendi fakat bu değişikliğin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu ve bu değişikliğin klinik açıdan önemli olmadığı ifade edilmiştir (36). Anoreksiya nevroza bozukluğu olan kişilerde grelin düzeyinin yükseldiği buna karşılık total eritrosit sayılarının ise azaldığı bildirilmiştir (37). Bulgularımızdan farklı olarak *in vitro* ortamda yapılan bazı çalışmalarda ise büyüme hormonu ve IGF-I'in eritrosit sayısını artırdığı tespit edilmiştir (19). Benzer şekilde büyüme hormonunun nanogram miktarının eritropoezi uyardığı bildirilmiştir (31).

Sonuç olarak sıçanlara dışarıdan 5 gün süreyle 10 nmol/kg dozda verilen grelinin muhtemelen lenfopoezi uyararak lenfosit sayısını artırabileceği belirlendi.

KAYNAKLAR

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
2. Aart J, Van der L, Tschop M, et al. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrin Rev.* 2005; 25: 426-457.
3. Aydın S. Ghrelin hormonunun keşfi: Araştırmaları ve klinik uygulamaları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32: 76-89.
4. Tschöp M, Smiley D, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
5. De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Med Sci Monit.* 2003; 9: 217-224.
6. Chang L, Ren Y, Liu X, et al. Protective effects of ghrelin on ischemia reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovas Pharmacol.* 2004; 43: 165-170.
7. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, et al. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54: 561-573.
8. Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, et al. Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology.* 2003; 144: 1787-1792.
9. Konuk T. *Pratik Fizyoloji. 2. baskı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınlar, 1981, Ankara.*
10. Yılmaz B. *Fizyoloji. 2. Baskı. Feryal Matbaacılık, 2000, Ankara.*
11. Amono H, Takesemima YM. Relationship of hematocrit values with age, lactation stage, nutrient levels of dairy cows and temperature. *J Jpn Med Assoc.* 1992; 45: 476-470.
12. Kumar R, Jindal R. *Hematological investiga-*

- tion in buffaloes from birth to sexual maturity. *In Vet J.* 1990; 67: 311-314.
13. Shaffer L, Roussel J D, Koonce K. Effects of age, temperature-season and breed on blood characteristics of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1981; 64: 62-70.
 14. Ford HC, Carter JM. Haemostasis in hypothyroidism. *Postgrad Med J.* 1990; 66: 280-284.
 15. Dixon RM, Cert VR, Reid S. W. J. et al. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet Rec.* 1999; 145: 481-487.
 16. Poppi VD, Dixit M, Baratta A, et al. Growth hormone secretagogue (GHS) analogue, hexarelin stimulates GH from peripheral lymphocytes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 2002; 110: 343-347.
 17. Astaldi Jr A, Yaicin B, Meardi G, et al. Effect of growth hormone on lymphocyte transformation in cell culture. *Blut* 1973; 26: 74-81.
 18. Dixit VD, Yang H, Sun Y, et al. Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2778-2790.
 19. Rapaport R and Moghaddas R. Growth hormone therapy and immune function. *Neuroimmune Biology* 2001; 1: 403-408.
 20. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm IGF Res.* 2009; 19: 187-197.
 21. LeRoith D, Yanowski J, Kaldjian EP, et al. The effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system of aged female monkeys. *Endocrinology* 1996; 137: 1071-1079.
 22. Yoshida A, Ishioka C, Kimata H, et al. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free medium. *Acta Endocrinologica* 1992; 126: 524-529.
 23. Sumita K, Hattori N, Inagaki C. Effects of growth hormone on the differentiation of mouse B lymphoid precursors. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97: 408-416.
 24. Xu G, Li Y, An W, et al. Ghrelin and cell differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008; 841-847.
 25. Maruna P, Gurlich R, Frasko R, et al. Ghrelin and leptin elevation in postoperative intra-abdominal sepsis, *Eur Surg Res.* 2005; 37: 354-359.
 26. Toussirost E, Streit G, Nguyen NU, et al. Adipose tissue, serum adipokines, and ghrelin in patients with ankylosing spondylitis. *Metabolism* 2007; 56: 1383-1389.
 27. Yada T, Kaiya H, Mutoh K, et al. Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J Endocrinol* 2006; 189: 57-65.
 28. Tumer C, Bilgin HM, Obay BD, et al. Effect of ghrelin administration on phagocytic activity in acute cold-restraint stress exposed rats. *Regul Peptides* 2007; 138: 113-117.
 29. Kooijman R, Berus D, Malur A, et al. Human neutrophils express GH-N gene transcripts and the pituitary transcription factor Pit-1b. *Endocrinology* 1997; 138: 4481-4484.
 30. Merchav S, Tatarsky I, Hochberg Z. Enhancement of human granulopoiesis in vitro by biosynthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and human growth hormone. *J Clin Invest* 1988; 88: 791-797.
 31. Golde DW, Bersch N, Li CH. Growth hormone: species-specific stimulation of erythropoiesis in vitro. *Science* 1977; 196: 1112-1123.
 32. Rapaport R, Sills IN, Green L, et al. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with

- growth hormone-binding protein levels. *J Clin Endocr Metab* 1995; 80: 2612-2619.
33. Sohmiya M, Kanazawa I and Kato Y. Effect of recombinant human GH on circulating granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils in patients with adult GH deficiency. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 211-215.
34. Vicini, J. L., S. Hudson, W. J. Cole, M. A. et al. Effect of acute challenge with an extreme dose of somatotropin in a prolonged release formulation on milk production and health of dairy cows. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2093-2097.
35. Ceppi A and Blum JW. Effects of growth hormone on growth performance, haematology, metabolites and hormones in iron-deficient veal calves. *J Vet Med A* 1994; 41: 443-458.
36. Eppard PJ, White TC, Sorbet RH, et al. Effect of exogenous somatotropin on hematological variables of lactating cows and their offspring. *J Dairy Sci*.1997; 80: 1582-91.
37. Baumann A, Heitmann S, Bubendorff V, et al. Laboratory changes in anorexia nervosa. *Praxis* 2010; 99: 661-667.