RESEARCH ARTICLE

Kıl keçisi abomasumunda ghrelin, obestatin ve leptin hormonlarının immunohistokimyasal dağılımları

Zelal Karakoç^{1*}, Uğur Topaloğlu², Muzaffer Aydın Ketani²

¹ Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

Geliş: 24.04.2019, Kabul: 10.09.2019

*zelalkarakoc@siirt.edu.tr

Immunohistochemical distribution of ghrelin, obestatin and leptin hormones in the abomasum of hair goat

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 4, 204-209

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.248

Öz

Amaç: Ghrelin, obestatin ve leptin hormonları iştah düzenleyici hormon olarak adlandırılırlar. Ghrelinin yemeyi başlattığı, obestatinin iştahı baskıladığı ve leptinin tokluk hissi verdiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda insan ve diğer memeli türlerinde ghrelinin, obestatinin ve leptinin midenin tüm bölümlerinden değişik yoğunluklarda eksprese olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışma kıl keçisi abomazumunda ghrelin, obestatin ve leptin hormonlarının ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 6-8 aylık oğlaklara ait abomazum dokuları temin edilip, abomazumun kardiya, fundus ve pilorus bölgelelerinden doku parçaları alındı. Rutin histolojik takipten sonra alınan kesitlere ghrelin, obestatin ve leptin immunohistokimya boyamaları uygulandı.

Bulgular: Yapılan histolojik değerlendirmede abomazumun her üç bölgesinde ghrelin, obestatin ve leptin için değişik yoğunlukta pozitif reaksiyon veren hücrelere rastlandı. Kardiya bölgesinde immunoreaktivitenin abomazum boyunca dağınık bir yerleşim gösterdiği ve fundus bölgesinde immunoreaktivitenin özellikle pariyetal hücrelerde olduğu belirlendi. Ortalama H skoruna göre ghrelinin kardiya bölgesinde, obestatinin pilorus bölgesinde ve leptinin fundus bölgesindeki hücrelerde yoğun olarak eksprese olduğu belirlendi.

Öneri: İştah düzenleyici hormonlar olan ghrelin, obestatin ve leptinin kıl keçilerinin abomazumunda kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden de değişik yoğunluklarda eksprese olması bu hormonların yem alımı üzerindeki fizyolojik etkileri göz önüne alındığında kıl keçilerinde de benzer fonksiyonları yerine getirdiğini düşündürmüştür. Ancak ghrelin, obestatin ve leptin hormonlarının hayvan beslenmesinde kullanımı ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Abomazum, immunohistokimya, kıl keçisi, iştah

Abstract

Aim: Ghrelin, obestatin and leptin hormones are called appetite regulating hormones. It reported that ghrelin initiates feeding, obestatin suppresses appetite and leptin gives a feeling of fullness. In human and other mammalian species, studies have reported that ghrelin, obestatin and leptin are expressed at different concentrations from all parts of the stomach. The present study was conducted to determine the expression of ghrelin, obestatin and leptin hormones in hair goat abomasum.

Materials and Methods: The abomasum tissues for the study were obtained from 6-8-month-old kids and were collected from cardia, fundus and pylorus regions of the animals' abomasums. The ghrelin, obestatin and leptin immunohistochemical staining methods were used, which were applied to all of the sections following the routine histological process.

Results: The immunoreactivity of ghrelin, obestatin and leptin was found to be different in all parts of the abomasum. Immunoreactivity was found to be dispersed settlement the abomasum in the cardia region. According to the mean H score, it was determined that ghrelin, obestatin and leptin were intensely expressed in the cardia, pilorus and fundus regions.

Conclusion: The appetite hormones (ghrelin, obestatin and leptin) were expressed at different concentrations from the cardia, fundus and pilorus regions in the abomazum, suggesting that these hormones perform similar functions in hair goats considering their physiological effects on feed intake. More research is needed to about use of animal nutrition of ghrelin, obestatin and leptin hormones.

Keywords: Abomasum, appetite hormones, hair goat, immunohis-

Giriş

Son yıllarda yapılan çalışmalarda gastrointestinal sistemde bulunan enteroendokrin hücrelerin sınıflandırılma çalışmaları tekrar değerlendirilmeye başlanmıştır. Endokrin hücre tiplerinin dağılımlarının midede bağırsaklardan farklı olduğu belirtilmiştir. İnsan midesinin fundus ve corpus bölgelerindeki oksintik bezlerin en önemli hücre tipleri; ghrelin hücreleri, somatostatin hücreleri, 5-HT (enterokromaffin) hücreleri, histamin salgılayan enterokromaffin benzeri (ECL) hücreleri ve pancreastatin hücreleri olduğu bildirilmiştir (Fakhry ve ark 2018).

Ghrelin, temel olarak mide fundusunda endokrin fonksiyona sahip X(A) hücreleri tarafından üretilen 28 amino asitlik (aa) lipopeptid yapıda bir hormondur (Date ve ark 2000, İlhan ve Erdost 2009). Yapılan çalışmalarda bu hormonun mideden başka duodenum, jejunum, ileum, kolon, beyin, tükürük bezi, tiroid bezi, kalp, pankreas, böbrekler, testisler, akciğer, plasenta, gonadlar, immün sistem gibi organlardan da eksprese olduğu bildirilmiştir (İlhan ve Erdost 2009, Özfiliz ve ark 2011, Comba ve ark 2015). İştah düzenleyici hormon (Appetite hormon) olarak da adlandırılır (Kojima ve Kangama 2005, Beasley ve ark 2009).

Obestatin ghrelin gibi aynı öncü proteinden üretilen 28 aa'lık lipopeptid yapıda bir hormondur. Obestatin anorektik bir peptid olup, ghrelin hormonu ile aynı gen tarafından kodlanmakta ve kilo alımını baskılamaktadır. Mide, ince barsak, hipotalamus ve hipofiz gibi birçok dokuda sentezlenmektedir. Obestatin ghrelinle ilişkili bir peptid olup ghrelinle zıt etki göstermektedir. Yeme esnasında salınarak tokluk hissi vermektedir (Kojima ve Kangama 2005, Beasley ve ark. 2009). Ghrelin yemeyi başlatırken, obestatinin iştahı baskıladığı düşünülmektedir (Kojima ve Kangama 2005, Beasley ve ark 2009).

Leptin yağ dokusundan salınan 16 kDa'lık bir peptid hormondur ve daha düşük seviyelerde gastrik epitelde, plasenta, karaciğerde, kas ve diğer birçok dokuda sentezlendiği bildirilmiştir (Wada ve ark 2014). Leptinin biyolojik etkileri arasında; tokluk hissi vermek, adrenal stress hormonlarının üretiminin azaltılmasını sağlamak, metabolik hızı ve seks dürtüsünü arttırmak yer almaktadır.

Ghrelin, obestatin ve leptinin kilo kontrolü üzerinde etkileri olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan literatür taramasında insanlarda ve farklı hayvan türlerinde ghrelin, obestatin ve leptin hormonları ile ilgili pek çok çalışma yapılmış, çalışmalarda bu hormonların midenin farklı bölümlerinden farklı yoğunluklarda eksprese olduğu bildirilmiştir (Hayashida ve ark 2001). Ancak kıl keçilerinde ghrelin, obestatin ve leptin hormonlarının ekspresyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan çalışma, kıl keçisi abomazumunda ghrelin, obestatin ve

leptin hormonlarının ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan materyali

Siirt'te hizmet veren belediyeye ait kesimhaneden olağan kesim sırasında aynı besi ortamında yetiştirilmiş 10 adet 6-8 aylık kıl keçisi abomazumu temin edildi. Daha sonra abomazumların kardiya, fundus ve pilorus bölümlerinden doku örnekleri alınarak, %10'luk formol solüsyonunda tespiti yapıldı. Yıkama işleminin ardından dokular rutin histolojik takipten geçirilip parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan Lecia RM 2125 rotary mikrotomunda 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitlere leptin, obestatin ve ghrelin ekspresyonları ve abomazum bölümlerindeki lokalizasyonlarını belirlemek için immunohistokimyasal boyama uygulandı. İmmunohistokimyasal yöntemin özgüllüğü sıçan uterus dokularına pozitif kontrol uygulanarak kontrol edildi (Şekil 1 a,b,c). Tüm dokulara aynı immunohistokimyasal yöntem uygulandı.

Şekil 1. Ghrelin, obestatin ve leptin için sıçan uterus dokusunda pozitif kontrol. (A) Ghrelin, (B) Obestatin, (C) Leptin. Orjinal büyütme: X20.

İmmunohistokimyasal yöntem

Parafin bloklardan alınan kesitler aminopropyltriethoxysilane (APES) ile kaplanmış adhesivli lamlara alındı ve deparafinizasyon, rehidrasyon işlemlerine tabi tutularak distile suda yıkandı. Kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 20 dakika muamele edilmesinin ardından 0.01 M Fosfat Buffer Saline (PBS)'de 5'er dakika süreyle üç defa yıkandı. Yıkamadan sonra, antijen retrieval işlemi için sitrat tamponu (0.01M, pH6.0) hazırlanarak 30 dakika süreyle 95 °C'de kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Kesitlerde spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere protein blocking çözeltisi (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation,

Fremont, CA, USA; TA-125UB) ile oda ısısında 15 dk. inkübasyona bırakıldı. Hemen ardından kesitler, 40C'de 1/100 seyreltilmiş anti-ghrelin primer antikor (Tavşan poliklonal ile Ghrelin-Anti-Ghrelin antikor, katalog no: ab129383-abcam) ile 1/200 seyreltilmiş anti-obestatin primer antikor (Obestatin-Antikor'a karşı tavşan poliklonal, katalog no: ab41704) ve 1/100 seyreltilmiş anti-leptin primer antikor (Leptin Anti-Leptin antikoruna tavşan poliklonal, katalog no: ab117751) gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 5 dakika süreyle 0.01M PBS'de dört kez yıkandı. Renk reaksiyonunu görselleştirmek için kromojen substrat olarak 3,3'-diaminobenzidinde (DAB) (Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) 4-10 dakika boyunca bekletildi (Saruhan ve ark. 2018). Mayers Hematoksilende zıt boyama için 1 dakika bekletildikten sonra kesitler mavileşinceye kadar çeşme suyunda yıkandı. Kesitler dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı. Boyamalar sonrası preparatlar, Nikon-Eclipse 400 DSRI Nikon dijital fotoğraf makinesi (NIS Elements Imaging Software-version 3.10) ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmunohistokimyasal değerlendirme

Ghrelin, leptin ve obestatin immunoreaktivitesinin semikantitatif analizleri H-skoru yöntemi kullanılarak yapıldı (Sur ve ark. 2017). Her hayvanın kardiya, fundus ve pilorus bölümlerinden rastgele seçilen üç bölüm değerlendirildi ve sırasıyla zayıf, orta, güçlü ve çok kuvvetli boyama yoğunluğuna göre 1, 2, 3 ve 4 olarak puanlandı. Her hayvan için H-skoru, aşağıdaki formülü kullanarak üretilen sayılar eklenerek hesaplandı;

$$\Sigma (1 + i) \times p_i$$

1: Sabit değer;

i: Yoğunluk puanı;

p_i: Yoğunluk yüzdesi.

Bulgular

Abomazumun kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde, ghrelin, leptin ve obestatin için luminal ve glandular hücrelerin sitoplazmalarında immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 2,3,4). Kardiya bölgesinde immunoreaktivitenin abomazum boyunca dağınık bir yerleşim gösterdiği belirlendi (Şekil 2 a,b,c). Fundus bölgesinde, kardiya bölgesi ile benzer reaksiyonlar belirlendi. Ancak bu bölgede immunoreaktivitenin özellikle parietal hücrelerde olduğu tespit edildi (Şekil 3 a,b,c). Pilorus bölgesinde immunoreaktivitenin ghrelin için özellikle luminal hücre sitoplazmalarında, obestatin ve leptin için ise glandular hücre sitoplazmalarında olduğu tespit edildi (Şekil 4 a,b,c).

Şekil 2. Abomazumun kardiya bölgesinde ghrelin, obestatin ve leptinin immunohistokimyasal demonstrasyonu. (A) Ghrelin, (B) Obestatin, (C) Leptin, oklar: immunoreaktif hücreler. Orjinal büyütme: (A, B) X20, (C) X10. l: lumen, g: kardiya bezleri.

Şekil 3. Abomazumun fundus bölgesinde ghrelin, obestatin ve leptinin immunohistokimyasal demonstrasyonu. (A) Ghrelin, (B) Obestatin, (C) Leptin, oklar: immunoreaktif hücreler, ok başı parietal hücreler. Orjinal büyütme: (A, B, C) X40. l: lumen, g: fundus bezleri.

Şekil 4. Abomazumun pilorus bölgesinde ghrelin, obestatin ve leptinin immunohistokimyasal demonstrasyonu. (A) Ghrelin, (B) Obestatin, (C) Leptin, oklar: immunoreaktif hücreler. Orjinal büyütme: (A, B, C) X40. l: lumen, g: pilorus bezleri.

Ghrelin immunoreaktivitesinin abomazumun kardiya ve pilorus bölgelerinde fundus bölgesine kıyasla arttığı belirlendi. Ortalama H skoru kardiya bölgesinde daha yüksek bulundu (Tablo 1, $p>0.05$). Obestatin immunoreaktivitesinin kardiya ve fundus bölgelerinden ziyade pilorus bölgesinde artış gösterdiği belirlendi. Ortalama H skoru pilorus bölgesinde en yüksek bulundu (Tablo 2, $p<0.001$). Leptin immunoreaktivitesinin kardiya ve fundus bölgelerinde arttığı belirlendi ve ortalama H skorunun kardiya ve fundus bölgesinde yüksek olduğu saptandı (Tablo 3, $p<0.001$).

sindeki glandular bezlerin apikal kısımlarından sentezlendiği bildirilmiştir. Yu ve ark (2012) Saanen ırkı sütçü keçilerin gastrointestinal kanalında yaptıkları çalışmada ghrelin hormonunun abomazum bezlerinden sentezlendiğini bildirmişlerdir. Sur ve ark (2017) farelerde gebelik dönemi boyunca fundus bölgesinde yaptıkları çalışmada ghrelin hormonunun gebelik döneminde artış gösterdiğini ve bu artışın özellikle gebeliğin erken ve orta döneminde en yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 1. Kıl keçisi abomasumunda ghrelin immunoreaktivitesinin H-skorları (Ort $\pm$ SP)

H-Skoru	Kardiya	Fundus	Pilorus
	198,54 $\pm$ 67,72 ^a	175,09 $\pm$ 33,46 ^b	184,90 $\pm$ 50,96 ^c

a,b,c Gruplar arası fark $p>0.05$

Tablo 2. Kıl keçisi abomasumunda obestatin immunoreaktivitesinin H-skorları (Ort $\pm$ SP)

H-Skoru	Kardiya	Fundus	Pilorus
	89,90 $\pm$ 44,37 ^a	75,81 $\pm$ 44,09 ^b	398,54 $\pm$ 70,99 ^c

a,b,c Gruplar arası fark $p<0.001$

Tablo 3. Kıl keçisi abomasumunda leptin immunoreaktivitesinin H-skorları (Ort $\pm$ SP)

H-Skoru	Kardiya	Fundus	Pilorus
	381,00 $\pm$ 61,04 ^a	391,63 $\pm$ 74,26 ^b	71,81 $\pm$ 57,92 ^c

a,b,c Gruplar arası fark $p<0.001$

Tartışma

Hayvanlarda iştah kontrolü, yem tercihi ve tüketimi vücut mekanizmalarıyla birlikte (homeostatic regulation) kontrol edilir (Polat ve ark 2006). Bu mekanizmalardan besin alımı üzerinde etkisi olan ghrelin, leptin ve obestatin hormonlarının mideden salgılanması ile ilgili insan, kemirgen ve diğer memeli türleri üzerine pek çok araştırma yapılmıştır (Date ve ark 2009, Hayashide ve ark 2001, Sakata ve Sakai 2010, Özfiliz ve ark 2011, Yu ve ark 2012).

Yapılan çalışmalarda farklı türlerde ghrelin hormonunun midenin temel hormonu olduğu ve bezlerin boyun bölgesinden dip kısmına kadar tüm hücrelerde, esas hücrelerde ve parietal hücrelerinden sentezlendiği bildirilmiştir (Hayashide ve ark 2001, Dun ve ark 2006, Gulubova ve ark 2018). İnsan midesinde ghrelin ile obestatinin kardiya, fundus, korpus ve antrum bölgelerindeki hücrelerden eksprese olduğu, bezlerin dip kısımlarında yoğun, kardiya ve fundus bölgesinde luminal mukozada daha az yoğunlukta olduğu bildirilmiştir (Grönberg ve ark 2008). Özfiliz ve ark (2011), koyun abomazumunda yaptıkları bir çalışmada ghrelin hormonunun abomazumun tüm bölümlerinde özellikle fundus bölge-

İlhan ve Erdost (2009), midenin fundus bölgesinin, pilorus bölgesine göre daha fazla ghrelin sentezlediğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da kıl keçilerinde abomazumun her üç bölümünde ghrelin immunoreaktivitesine rastlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda ghrelin ekspresyonunun fundus bölgesinde daha yoğun olduğu bildirilmiş olmasına rağmen sunulan çalışmada kıl keçilerinde ortalama H skoruna göre kardiya bölgesinde daha fazla ghrelin sentezlendiği belirlenmiştir. Ayrıca ghrelin immunoreaktivitesinin kıl keçilerinde de koyunlardakine benzer sonuçlar vermesi, ghrelin hormonunun koyun ve keçilerde aynı fizyolojik etki gösterdiğini düşündürmüştür.

Obestatin ve ghrelinin metabolik ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde birlikte işlevsel bir rol oynadığı ve vücut ağırlığının kontrolünde anahtar rol oynadıkları bildirilmiştir (Saruhan ve ark 2018). Obestatinin ghrelinle zıt etki gösterdiği ve gıda alımını ve vücut ağırlığının artmasını baskıladığı bildirilmiştir (Dun ve ark 2006). Dun ve ark (2006) rat midesinde yaptıkları çalışmada ghrelin gibi obestatinin de midenin glandular bezlerinde, muskuler tabakanın yakın-

larında ve daha zayıf olarak bezlerin boyun kısmından eksprese olduğu bildirmişlerdir. Tsokalis ve ark (2009) sağlıklı insanların midesinden alınan örneklerde yaptıkları çalışmada obestatinin midenin kardiya, fundus, korpus ve antrum bölgelerinde immunoreaktivitenin olduğu, reaksiyonun fundus bölgesindeki bezlerde yoğun, bezlerin boyun kısımları ile antrum ve korpus bölgelerinden ise daha az oranda eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada kıl keçilerinin abomazumunun tüm bölümlerinde obestatin immunoreaktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Ortalama H skoru pilorus bölgesinde en yüksek bulunmuştur. Tsokalis ve ark (2009) tarafından sağlıklı insan midesinde obestatinin özellikle fundus bölgesinde eksprese olduğu bildirilmiş, sunulan çalışmada ise kıl keçilerinde obestatinin özellikle pilorus bölgesinden eksprese olduğu, Ayrıca obestatin immunoreaktivitesinin glandular bezlerde daha yoğun olması daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir.

Leptinin biyolojik etkileri arasında; tokluk hissi vermek, adrenal stres hormonlarının üretiminin azaltılmasını sağlamak, metabolik hızı ve seks dürtüsünü arttırmak yer almaktadır (Gülle ve ark 2009). İnsan mide bezlerinden leptinin eksprese olduğu bildirilmiş, immunoreaktivitenin mide bezlerinin alt kısımlarındaki hücrelerde ve ayrıca esas hücrelerdeki pepsinojen granüllerinde olduğu belirtilmiştir (Cinti ve ark 2000). Leptinin insan mide bezlerindeki immunoreaktivitesinin orta şiddetten kuvvetliye kadar değişen yoğunluklarda olduğu bildirilmiştir (Gülle ve ark 2009). Rat midesinde yapılan çalışmada leptin hormonunun yüzey epitel hücrelerinde, gastrik bezlerde ve midenin esas hücrelerinde immunoreaktivitenin olduğu bildirilmiştir (Gülle ve ark 2009). Sunulan çalışmada abomazumun her üç bölümünde leptin immunoreaktivitesine rastlanmıştır. Immunoreaktivitenin kardiya ve fundus bölgelerinde, özellikle de fundus bölgesindeki parietal hücrelerde olması Gülle ve ark (2009)'ı desteklemektedir.

Öneriler

Ghrelin, obestatin ve leptin hormonlarının diğer türlerde olduğu gibi kıl keçilerinde abomazumun kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden eksprese olduğu ve bu hormonların fizyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında kıl keçilerinde de benzer fonksiyonları yerine getirdiği düşünülmüştür. İştah düzenleyici hormon olarak tanımlanan ghrelin, obestatin ve leptinin özellikle çiftlik hayvanlarında hayvan beslemede yem tüketimi ile besi performansı arasında yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Beasley JM, Ange BA, Anderson CAM, Miller III ER, et al., 2008. Characteristics Associated With Fasting Appetite Hormones (Obestatin, Ghrelin, and Leptin). *Obesity*, 17, 349-354.

Cinti S, Matteis RD, Picó C, Ceresi E, et. al., 2000. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24,789-93.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, et. al., 2000. Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans. *Endocrinology*, 141 (11), 4255-4261.

Dun SL, Brailoiu GC, Brailoiu E, Yang J, et. al., 2006. Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *Journal of Endocrinology*, 191, 481-489.

Ergün A, 1999. Leptin (Ob Protein). *T Klin Tıp Bilimleri*, 19, 130-136.

Fakhry J, Stebbing MJ, Hunne B, Bayguinov Y, Ward SM, et. al., 2019. Relationships of endocrine cells to each other and to other cell types in the human gastric fundus and corpus. *Cell Tissue Res*, 376(1), 37-49.

Grönberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, et. al., 2008. Distribution of Obestatin and Ghrelin in Human Tissues: Immunoreactive Cells in the Gastrointestinal Tract, Pancreas, and Mammary Glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(9), 793-801.

Gulubova MV, Tolekova AN, Ivanova K, Hamza S, et. al., 2019. Fructose-induced metabolic disturbances in rats and its impact on stomach endocrine cell number and smooth muscle contractility. *The Journal of Metabolic Diseases*, doi: 10.1080/13813455.2018.1555601.

Gülle K, Uyanıkgil Y, Karaöz E, 2009. Sıçan midesinde leptin ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 48(1), 1-6.

Hayashida T, Murakami K, Mogic K, Nishiharac M, et. al., 2001. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology*, 21, 17-24.

İlhan T, Erdost H, 2009. Ghrelin. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med*, 28 (1), 67-74.

Kojima M, Kangawa K, 2005. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol Rev*, 85, 495-522.

Okuhara Y, Kaiyac H, Teraokaa H, Kitazawaa T, 2016. Structural determination, distribution, and physiological actions of ghrelin in the guinea pig. *Peptides*, 99, 70-81.

Özfiliz N, Tütüncü Ş, Erdost H, 2011. Immunohistochemical distribution of ghrelin positive cells in the abomasum of sheep. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 58, 61-64.

Polat SE, Coşkun B, Gürbüz E, Balevi T, et. al., 2006. Farklı Kaba Yemlerle Beslenen Kuzuların Yem Tüketim ve Davranışlarının Kamera Kaydıyla İzlenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 22(3-4), 5-14.

Rindi G, Vittorio Necchi V, Torsello ASA, Zoli M, et. al., 2002. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*, 117,511-519.

Sakata I, Sakai T, 2010. Ghrelin Cells in the Gastrointestinal Tract. *International Journal of Peptides*, doi:10.1155/2010/945056.

- Sur E, Öznurlu Y, Özyaydın T, 2017. The determination of ghrelin immunoreactivity in gastric mucosa of fundus during pregnancy in mice. *International Journal of Biomedical Research*. 8(12), 672-676.
- Saruhan BG, Erdoğan S, Topaloğlu U, Akbalık ME, et. al., 2018. Expression and Biological Activity of Ghrelin, Obestatin and Leptin In Deferent Ducts of The Bull and Ram. *Slov Vet Res*, 55 (3), 151-9.
- Tsolakis AV, Grimelius L, Stridsberg M, Falkmer SE, et. al., 2009. Obestatin/ghrelin cells in normal mucosa and endocrine tumours of the stomach. *European Journal of Endocrinology*, 160, 941-949.
- Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, et. al., 2014. Leptin and its receptors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 61-62, 191-199.
- Yu G, Zhang W, Huang Y, Ding L, et. al., 2012. Expression and Distribution Pattern of Ghrelin in the Gastrointestinal Tract of Saanen Dairy Goat. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11(24), 4585-4592.