



Инструкция пользователя



Лептин



EIA-2395



96 **определений**

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ВВЕДЕНИЕ**1.1 Наименование и назначение**

Иммуноферментный анализ для количественного in vitro определения лептина в сыворотке и плазме.

1.2 Общая информация

Лептин вырабатывается главным образом в адипоцитах белой жировой ткани, циркулирует в крови в свободной форме и связан с белками (1). У млекопитающих лептин плеiotропный, регулирующий множество физиологических процессов. Лептин снижает аппетит и потребление пищи и подавляет выработку глюкозы в печени, синтез жирных кислот и экспрессию резистина. Напротив, лептин увеличивает расход энергии, вызывая окисление жирных кислот в печени и мышцах. Более того, лептин стимулирует секрецию инсулина и поглощение глюкозы, а также секрецию воспалительных цитокинов (2,3). Лептин служит липостатическим сигналом и передает важную информацию о метаболическом состоянии в мозг, стимулируя выработку нейронами анорексигенных проопиомеланокортина /кокаин-амфетамин- регулируемого транскрипта и ингибируя выработку орексигенных нейропептида Y и агути-подобного белка(4,5). Лептину противодействует гормон грелин. Оба гормона действуют на рецепторы в дугообразном ядре гипоталамуса, чтобы регулировать аппетит для достижения энергетического гомеостаза (6).

Хотя циркулирующий лептин уменьшает аппетит, у людей с ожирением обычно наблюдается более высокая концентрация циркулирующего лептина, чем у здоровых людей из-за более высокого процента жира в их организме (7). Эти люди демонстрируют резистентность к лептину, аналогичную резистентности к инсулину при диабете 2 типа, при этом повышенные уровни не способны контролировать голод и вес. При ожирении снижается чувствительность к лептину, что приводит к неспособности фиксировать насыщение, несмотря на высокие запасы энергии (8). Хотя регулирование жировых запасов считается основной функцией лептина, он также играет роль в других физиологических процессах, о чем свидетельствуют многочисленные источники его синтеза, помимо жировых клеток, а также то, что многие типы клеток имеют рецепторы лептина наряду с гипоталамическими клетками.

Лептин-дефицитные патологии, как правило, сопровождаются гиперфагией и ожирением (9,10). Крайние степени ожирения можно наблюдать при мутации рецептора лептина. Анорексигенные свойства лептина благоприятно сказываются на людях с дефицитом лептина, при его введении приводя к уменьшению потребления пищи и снижению массы тела (11,12).

В заключение можно сказать, что измерение уровня лептина может быть использовано для дифференциальной диагностики ожирения с лептин-резистентностью.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор ДРГ Лептин ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на принципе «сэндвича».

Микротитровальные лунки покрыты моноклональными антителами, специфичными к уникальному антигенному сайту на молекуле лептина.

Аликвота пробы пациента с эндогенным лептином инкубируется в лунке со специфичным биотинилированным моноклональным анти-лептин антителом. Формируется «сэндвич-комплекс». После инкубации несвязанный материал отмывается и добавляется конъюгат (ферментный комплекс стрептавидин-пероксидаза) для обнаружения связанного лептина.

После добавления субстрата, определяется интенсивность полученного окрашивания, которая пропорциональна концентрации лептина в образце.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования. **Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно, сравните английскую инструкцию с русской, отдавая предпочтение английской и обращая особое внимание на состав набора и процедуру анализа. Убедитесь, что вам все понятно.**

2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
3. Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте емкости только для одного компонента. Это особенно важно для емкостей с субстратом. Использование для дозирования субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, т.к. это может привести к загрязнению реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
8. Не допускайте высыхания лунок во время анализа; добавляйте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на измерение абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на результаты образцов пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при внесении образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калиброванных пипеток и микропланшетного ридера.
16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных микропланшетов даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и, в результате, характеристики связывания у микропланшетов могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0,5M H₂SO₄. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты, входящие в набор

1. **Микротитровальные лунки**, 12 x 8 (делимые) стрипы, 96 лунок, Сорбированное на лунках анти-лептин антитело (моноклональное)
2. **Стандарты (0-5)**, 6 флаконов (лиофилизированные), 0,5 мл, концентрации: 0, 2, 5, 25, 50 и 100 нг/мл.
См. «Приготовление реагентов»;
содержит безртутный консервант.
3. **Контроли (Низкий и Высокий)**, 2 флакона, (лиофилизированные), 0,5 мл,
Значения и диапазоны смотрите на этикетке флакона или паспорте качества

См. «Приготовление реагентов»;
содержит безртутный консервант.

4. **Инкубационный буфер**, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию, содержит безртутный консервант.
5. **Антисыворотка**, 1 флакон, 11 мл, готова к использованию, Моноклональное биотинилированное анти-лептин антитело, содержит безртутный консервант.
6. **Ферментный комплекс**, 1 флакон, 11 мл, готов к использованию, Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, Содержит безртутный консервант.
7. **Субстрат-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию Тетраметилбензидин (ТМВ).
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0,5 М H₂SO₄.
9. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл, (40X конц.), См. «Приготовление реагентов»;

Внимание: Дополнительный Нулевой Стандарт для разведения образцов доступен по запросу.

4.2 Дополнительные материалы и приборы:

- Микротитровальный ридер (450 ± 10 нм) (напр. Микротитровальный ридер DRG Instruments).
- Калиброванные микропипетки переменного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизованная вода
- Таймер
- Бумага для построения калибровочной кривой или программное обеспечение для обработки данных

4.3 Хранение и стабильность реагентов.

При хранении при 2° ÷ 8°С невскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при 2° ÷ 8°С. Микротитровальные лунки хранить при 2° ÷ 8° С. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке.

4.4 Приготовление реагентов

Перед использованием довести все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Стандарты

Восстановить лиофилизированное содержимое флаконов со стандартами 0,5 мл дистиллированной воды и оставить на 10 минут при комнатной температуре. Перемешать содержимое флакона несколько раз перед использованием.

Примечание: Восстановленные стандарты стабильны по меньшей мере 6 недель при 2-8°С. Для длительного хранения заморозить до -20°С.

Контроли

Восстановить лиофилизированное содержимое каждого флакона. 0,5 мл дистиллированной воды и оставить на 10 минут при комнатной температуре. Перемешать содержимое флакона несколько раз перед использованием.

Восстановленные контроли стабильны по меньшей мере 6 недель при 2-8°С. Для длительного хранения заморозить до -20°С.

Промывочный раствор

Добавить деионизированную воду в 40X концентрированный промывочный раствор.

Развести 30 мл Концентрата промывочного раствора в 1170 мл деионизованной воды до окончательного объема 1200 мл.

Разведенный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности. (см.п.13)

4.6. Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В этом исследовании могут использоваться сыворотка или плазма.

Не использовать гемолизные, желтушные и жирные образцы.

Обратите внимание: образцы, содержащие азид натрия, не могут использоваться с этим набором.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венопункцией, дать свернуться и отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

Плазма:

Цельная кровь забирается в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт и немедленно центрифугируется.

5.2 Хранение и Подготовка образцов

Образцы, закрытые крышками, могут храниться до 24 часов при 2 – 8 °С перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при -20°C. Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Если во время начального анализа обнаружили, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец необходимо развести Нулевым Стандартом, и исследовать повторно согласно процедуре Анализа.

Для расчета концентрации необходимо учитывать фактор разведения.

Например:

А) разведение 1:10 10 мкл сыворотки + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешать)

Б) разведение 1:100 10 мкл. Разведенной сыворотки А) 1:10 + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешать)

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры. Все реагенты должны быть смешаны без образования пены

- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.

- Используйте новые одноразовые пластиковые насадки для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации

- Поглощение - это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.

- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Необходимо строить калибровочную кривую для каждой постановки.

1. Закрепить необходимое количество микротитровальных лунок в держателе.
2. Внести по **15 мкл Стандартов/Контролей/Образцов** в соответствующие лунки, используя новые одноразовые наконечники.
3. Внести по **100 мкл инкубационного буфера** в каждую лунку.

- Тщательно мешать 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубировать **120 мин** при комнатной температуре без накрывания панели.
 5. Резко вытряхнуть содержимое лунок.
Промыть лунки 3 раза разведенным промывочным раствором, 300 мкл на лунку. Выстучать оставшиеся капли на абсорбирующую бумагу.
Примечание: Чувствительность и точность зависит от правильной постановки процедуры промывки.
 6. Внести по **100 мкл** Антисыворотки в каждую лунку.
 7. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
 8. Резко вытряхнуть содержимое лунок.
Промыть лунки 3 раза разведенным промывочным раствором (300 мкл на лунку).
Выстучать оставшиеся капли на абсорбирующую бумагу.
 9. Внести по **100 мкл** Ферментного комплекса (HRP) в каждую лунку.
 10. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре.
 11. Резко вытряхнуть содержимое лунок.
Промыть лунки 3 раза разведенным промывочным раствором (300 мкл на лунку).
Выстучать оставшиеся капли на абсорбирующую бумагу.
 12. Внести по **100 мкл** Субстрат-раствора в каждую лунку.
 13. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
 14. Остановить реакцию добавлением **50 мкл** стоп-раствора в каждую лунку
 15. Определить абсорбцию (ОП) при **450 ± 10 нм** не позднее 10 минут после добавления Стоп-Раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Рассчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую: отложить значения абсорбции каждого стандарта напротив их концентраций, абсорбции - на оси Y, концентрации - на оси X.
3. Используя среднее значение абсорбции образцов пациентов определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты данной инструкции были посчитаны с использованием подгонки кривой по 4-параметрической логистической функции (4 PL). (4 PL по Rodbard или 4 PL по Marquardt – рекомендуемые методы выбора) Другие функции обработки данных могут дать отличающийся результат.
5. Концентрации образцов можно считать прямо с данной стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем максимальный стандарт, необходимо дополнительно разбавить. При подсчете результатов необходимо учитывать кратность разведения.

6.3.1 Пример стандартной кривой

Следующие данные приведены только для демонстрации и не могут использоваться для получения результатов во время анализа.

Стандарт	Оптическая плотность (ОП) (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	0,02
Стандарт 1 (2 нг/мл)	0,07
Стандарт 2 (5 нг/мл)	0,16
Стандарт 3 (25 нг/мл)	0,74
Стандарт 4 (50 нг/мл)	1,41
Стандарт 5 (100 нг/мл)	2,30

7 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать собственные нормальные и патологические значения.

В исследовании, проведенном на нормальных здоровых взрослых, используя набор ДРГ Лептин ИФА, были получены следующие данные:

Население	нг/мл
Мужчины	3,84 ± 1,79
Женщины	7,36 ± 3,73

Результаты анализа не могут быть единственной причиной терапевтического заключения. Результат должен коррелировать с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестами.

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует постановки контролей с каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализировано, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории.

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами. Использование контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов. Используйте контроли с нормальными и патологическими уровнями.

Контроли и соответствующие им результаты, полученные Лабораторией Контроля Качества указаны в Паспорте Качества, приложенном к набору. Значения и диапазоны, указанные на листе КК, всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов. Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки.

После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон исследования

Диапазон данного исследования варьируется от 0,7 до 100 нг/мл.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реакция)

Следующие вещества были протестированы на кросс-реактивность:

Вещество	Перекрестная реакция
Лептин человека	100 %
Лептин крысы	<0,2 %
Лептин мыши	<0,2 %
Инсулин человека	Н.о.
Проинсулин человека	Н.о.
Инсулин крысы	Н.о.
С-пептид человека	Н.о.
Клюкагон	Н.о.
IGF-I	Н.о.

Н.о. – не определяется

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность вычислена как среднее значение + 2 стандартных отклонения двадцати повторных исследований нулевого стандарта и составляет 0,7нг/мл.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Внутривыставочная

Вариабельность внутри одной постановки показана ниже:

Образец	n	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	20	3,2	7,3
2	20	27,5	7,1

3	20	1,1	4,2
---	----	-----	-----

КВ – коэффициент вариации

9.4.2 Межпостановочная

Вариабельность между постановками показана ниже:

Образец	n	Среднее (нг/мл)	КВ (%)
1	6	1.4	6.9
2	6	3.7	3.7
3	6	9.7	9.1

КВ – коэффициент вариации

9.5 Извлечение

В образцы были добавлены известные концентрации лептина. Процент извлечения был вычислен умножением отношения измеренных и ожидаемых значений на 100 (ожидаемое значение = (эндогенный лептин + добавленный лептин)/2 (вследствие разведения сыворотки влитым материалом 1:2)).

		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация (нг/мл)		4.6	21.4	9.6
Среднее значение извлечения		88.8	97.0	94.8
Диапазон извлечения (%)	от	86.8	90.6	84.0
	до	93.1	102.1	106.0

9.6 Линейность

		Образец 1	Образец 2	Образец 3
Концентрация (нг/мл)		4.6	21.4	9.6
Среднее значение извлечения		93.2	92.7	104.7
Диапазон извлечения (%)	от	85.1	86.2	88.0
	до	107,5	103.1	114.3

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены, если процедура осуществляется с полным пониманием приложенной инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики. Любое неправильное обращение с образцами или модификация данного теста могут повлиять на результаты.

10.1 Мешающие вещества Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5мг/мл) и триглицериды (до 30мг/мл) не влияют на результаты анализа.

10.2 Влияние медикаментов

На сегодняшний день неизвестны медикаменты, которые имеют влияние на измерение лептина в образце.

10.3 Эффект занижения при высоких концентрациях (Хук-эффект)

Для данного теста хук-эффект не наблюдается до концентрации 500нг/мл лептина.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.

Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственности производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.

12 ЛИТЕРАТУРА

1. Londraville RL, et al. Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. *Gen Comp Endocrinol* (2014) 203:146–57.
2. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* (2004) 59:305–32.
3. Arora S. Leptin and its metabolic interactions – an update. *Diabetes Obes Metab* (2008) 10(11): 973–93.
4. Elias CF et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* (1999) 23(4):775–86.
5. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* (2001) 74(4):703–8.
6. Brennan AM, Mantzoros CS (2006). Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2 (6): 318–27.
7. Considine RV et al.(1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans". *N. Engl. J. Med.* 334 (5): 292–5.
8. Pan H, Guo J, Su Z (May 2014). "Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity". *Physiology & Behavior.* 130: 157–169.
9. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* (2006) 55(Suppl 2):145–54.
10. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* (2000) 11(8): 327–32.
11. Weigle DS et al. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* (1995) 96(4):2065
12. Farooqi IS et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* (2002) 110(8):1093–103.