Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(95): 62-69

The association of LEP gene Arg105Trp polymorphism and female infertility in the population of Guilan

Ghorbani Z[1], Vaziri HR[2*], Zahiri Z[3]

1- Department of Biology, International Pardis, University of Guilan, Rasht, Iran
2- Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Department of Obstetrics and Gynecology, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 12 Oct 2014, Accepted: 17 Dec 2014

Abstract

Background: Nowadays, the decline in birth rate is one of the most important social problems in developing societies. Infertility is defined as a failure to conceive in a couple trying to reproduce after one year of regular intercourse without contraception. Leptin have been implicated in maintaining normal female reproductive functions, including lactation, folliculogenesis, ovarian steroidogenesis, the maintenance of mammary gland morphology, the development of dominant follicles and oocytes, the maturation of the uterus endometrium, and menstrual cycle regulation. Sinyle-nucleotide polymorphism T>C found in exon 3 leads to substitution of Arg>Trp at codon 1.5 (R105W). In this case-control study, we aimed to evaluate the association of this polymorphism and the risk of female infertility in the population of Guilan.

Materials and Methods: Blood Samples were collected from 86 patients diagnosed with female infertility and 60 control subjects, and genotyped by allele-specific PCR (AS-PCR). To estimate the association between genotype and allele frequencies in cases and controls, Chi-Square(χ^2) analysis was used.

Results: Analysis revealed no significant differences were found in genotype and allele distributions of LEP Arg105Trp between infertility cases and controls (p= 0.21, p= 0.2) in this population.

Conclusion: Our findings indicated no significant association between the Arg105Trp polymorphism and female infertility risk (p=0.21). While, more studies are needed to confirm the results.

Keywords: Female Infertility, Leptin, Polymorphism

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
Email: Vaziri@guilan.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۲ (شماره پیاپی۹۵)، اردیبهشت ۱۳۹۴، ۶۹-۶۲

ارتباط پلی مورفیسم Arg105Trp ژن LEP و ناباروری زنان در جمعیت گیلان

زکیه قربانی[۱]، حمیدرضا وزیری[۲*]، زیبا ظهیری[۳]

۱-کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

۳- دانشیار، گروه زنان و زایمان، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: امروزه کاهش میزان زاد و ولد یکی از مهم‌ترین مشکلات اجتماعی جوامع در حال توسعه می‌باشد. «ناباروری» به عدم بارداری پس از یک سال مقاربت متوالی و منظم زوجین بدون استفاده از روش‌های پیش‌گیری اطلاق می‌شود. لپتین در تنظیم عملکرد طبیعی سیستم تولید مثل زنان شامل تولید شیر، ایجاد فولیکول‌ها، تولید استروئیدهای تخمدانی، حفظ عملکرد و مورفولوژی غدد شیری، رشد و بقای فولیکول‌ها و اووسیت ها، بلوغ اندومتر رحم و تنظیم چرخه قاعدگی نقش به سزایی دارد. پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی T>C در اگزون شماره ۳ منجر به جانشینی Arg>Trp در کدون ۱۰۵ می‌گردد (R105W). در این پژوهش مورد- شاهدی به بررسی ارتباط این پلی مورفیسم و ناباروری زنان در جمعیت گیلان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون از ۸۶ زن مبتلا به ناباروری و ۶۰ فرد سالم جمع‌آوری شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تحت AS-PCR قرار گرفت. هم‌چنین به منظور بررسی ارتباط بین فراوانی ژنوتیپی و اللی در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای مربع (χ^2) استفاده گردید.

یافته‌ها: بررسی‌های مربوط به دو گروه بیمار و کنترل نشان داد با توجه به مقدار p=۰/۲۱ و هم‌چنین p=۰/۲ آللی، ارتباطی بین پلی مورفیسم کدون ۱۰۵ ژن لپتین (Arg105Trp) و ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها حاکی از عدم ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم Arg105Trp و ناباروری زنان بود (p=۰/۲۱). با این وجود، تایید نتایج به دست آمده مستلزم بررسی‌های بیشتری است.

واژگان کلیدی: ناباروری زنان، ژن لپتین، پلی مورفیسم

***نویسنده مسئول:** گیلان، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email:Vaziri@guilan.ac.ir

مقدمه

«ناباروری» به عدم بارداری پس از یک سال مقاربت متوالی و منظم زوجین بدون استفاده از روش‌های پیش‌گیری از بارداری اطلاق می‌شود(۱). ناباروری یکی از مشکلات سلامت تولید مثل است که منجر به آسیب‌های روانی و عاطفی زوجین می‌گردد و زندگی اجتماعی آنان را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۲). با توجه به پدیده‌های اجتماعی مانند تمایل برای ازدواج و بچه‌دار شدن در سنین بالاتر و هم‌چنین افزایش استفاده از روش‌های جلوگیری از بارداری، میزان ناباروری در ۳۰ سال اخیر افزایش یافته است. ناباروری یک سندرم چند عاملی است که شرایط محیطی و ژنتیکی در ایجاد آن دخیل می‌باشند(۳). امروزه ناباروری با تاثیرگذاری بر حدود ۱۵ درصد زوج‌هایی که برای داشتن یک فرزند تلاش می‌کنند، یک مشکل بزرگ حوزه سلامت محسوب می‌شود. با این که پیشرفت‌های عظیمی در شناخت فیزیولوژی تولید مثل انسان اتفاق افتاده است، اما هنوز دلایل اصلی ناباروری تقریبا در ۵۰ درصد موارد ناشناخته باقی مانده است(۴). از این رو پرداختن به این موضوع امری جدی و ضروری است.

امروزه بحث ارتباط پلی مورفیسم‌های ژنتیکی و استعداد ابتلا به برخی بیماری‌ها از جمله مباحث مهم تلقی می‌گردد. به آلل‌های مختلف یک ژن در جمعیت یک گونه که فراوانی آن بیش از ۱ درصد باشد و ژنوتیپ‌های متفاوت را ایجاد کند «پلی‌مورفیسم» می‌گویند(۵).

هورمون مشتق از چربی لپتین (LEP) یک تنظیم کننده مهم در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی بدن است(۶). بافت چربی به عنوان یک تنظیم کننده مهم سوخت و ساز بدن شناخته می‌شود(۷). هم‌چنین لپتین، تنظیم کننده غالب در جذب غذا و مصرف انرژی می‌باشد(۸). لپتین در سلول‌های بافت چربی سفید و جفت بیان می‌شود. mRNA لپتین به صورت گزینشی در بخش‌های خاصی از مغز، هیپوفیز و تروفوبلاست بیان می‌گردد(۹). علاوه بر این به مقدار کمتر در بافت چربی قهوه‌ای، کبد، سلول‌های اپی تلیال پستان، ماهیچه اسکلتی و تخمدان تولید می‌شود. نقش اصلی این ژن در تنظیم وزن بدن و سوخت و ساز انرژی است(۱۰). لپتین با اتصال به گیرنده‌های هیپوتالاموسی، یک نقش تنظیمی در عملکرد سیستم درون ریز، متابولیسم انرژی و محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-گنادی دارد. در حالت طبیعی، افزایش میزان لپتین باعث شروع فرایند بلوغ می‌شود و سطح نرمال آن برای قاعدگی و تولید مثل طبیعی مورد نیاز است(۱۱). علاوه بر این، لپتین بر سایر اندام‌های تولید مثل مانند اندومتر، جفت و غدد شیری نیز اثر می‌گذارد و باعث ایجاد فرایندهای مهم فیزیولوژیکی مانند بارداری و شیردهی می‌گردد(۱۲). لپتین موجب افزایش ترشح هورمون‌های گنادوتروپین شده که برای شروع و حفظ تولید مثل طبیعی ضروری هستند. همچنین، تنظیم کننده عملکرد تولید مثل از طریق تغییر حساسیت غده هیپوفیز به هورمون آزادکننده گنادوتروپین و عمل تخمک‌گذاری برای تنظیم استروئید فاز لوتئال و فولیکولار است(۱۳).

این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ منطقه ۳۱ باند ۳ قرار دارد (۷q۳۱.۳) و حاوی ۳ اگزون و ۲ اینترون است(۱۴). پروتئین حاصل از این ژن، یک پروتئین ترشحی با اندازه ۱۶kDa معادل ۱۶۷ اسید آمینه است. پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی T>C در اگزون شماره ۳ منجر به جانشینی Arg>Trp در کدون ۱۰۵ می‌گردد(۱۵). این پژوهش به بررسی ارتباط پلی مورفیسم R105W ژن لپتین- به عنوان یکی از عوامل احتمالی موثر- با ناباروری زنان پرداخته می‌شود.

مواد و روش ها

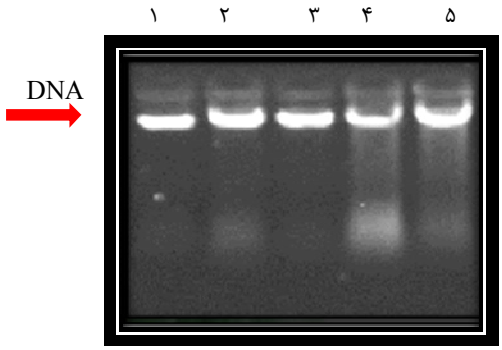
نمونه گیری

در این مطالعه مورد- شاهدی، ۸۶ زن مبتلا به ناباروری و ۶۰ فرد سالم (به عنوان گروه کنترل) مراجعه کننده به بخش ناباروری بیمارستان الزهرا شهرستان رشت، در بازه زمانی خرداد ماه ۱۳۹۲ تا تیر، ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفتند. سابقه ناباروری در افراد بیمار حداقل ۲ سال بود و گروه کنترل نیز زنان سالم دارای ۲ فرزند را در برمی‌گرفت. دامنه سنی بیماران و افراد کنترل بین ۲۸ تا ۴۲

سال انتخاب شد. پس از تکمیل پرسش‌نامه حاوی اطلاعات افراد و دریافت رضایت نامه، ۲ میلی‌لیتر خون از آنها گرفته شد و جهت استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی از طریق کیت Gpp Solution (شرکت ژن پژوهان ایران) و بر اساس پروتکل کیت از نمونه‌های خون افراد استخراج گردید. پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۱)، DNA تا قبل از بررسی‌های مولکولی به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌متر انتقال داده شد.



شکل ۱. DNA استخراج شده (ژل آگارز ۱ درصد)

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

در واکنش PCR مربوط به ژن مورد نظر، از دستگاه ترموسایکلر ۴۸ چاهکی (شرکت بیوراد انگستان) و از دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده جهت تکثیر محدوده ژنی قطعه پلی مورفیک استفاده گردید (جدول ۱). شرایط PCR جهت تکثیر ناحیه اگزون شماره ۳ (کدون ۱۰۵) عبارت بود از: واسرشت سازی رشته ۵ به مدت دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه جهت طویل شدن پرایمرها و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور گسترش نهایی رشته. شناسایی پلی مورفیسم کدون ۱۰۵ از طریق تکنیک AS-PCR صورت گرفت و واکنش PCR به صورت مجزا (واکنش دو تیوبی مجزا، یک تیوب حاوی واکنش همراه پرایمرهای پیشرو و پسرو آلل T و تیوب دیگر واکنش به وسیله پرایمرهای پیشرو و پسرو آلل G) برای هر آلل صورت گرفت. بدین منظور ۵ میکرو لیتر از DNA استخراج شده، ۱۰ میکرولیتر مخلوط اصلی PCR (شرکت سیناژن ایران)، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو، ۱ میکرولیتر پرایمر پسرو و ۳ میکرولیتر آب مقطر با هم مخلوط شد مخلوط شد و تحت AS-PCR قرار گرفت. سپس صحت واکنش PCR انجام شده از طریق ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه پلی مورفیک

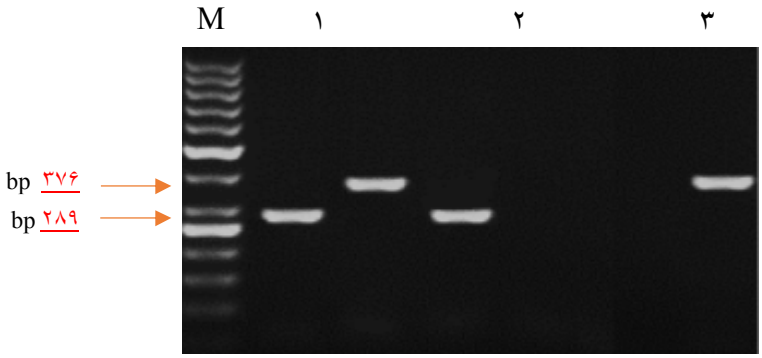
پلی مورفیسم	آلل	اندازه تکثیر (bp)	قطعه شده	توالی آغازگرها(bp)
Arg105Trp	T	۲۸۹		F:5′-CAACGACCTGGAGAACCCCT-3′ R:5′-CTTCAATCCTGGAGATACCTG-3′
Arg105Trp	C	۳۷۶		F: 5′- CAACGACCTGGAGAACCCCC -3′ R: 5′- GCTTAGGGTCTTATGCCTT -3′

تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار مدکالک نسخه ۱۲.۱.۴.۰ صورت گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون کای مربع (χ^2) استفاده گردید؛ در این آزمون $p\geq ۰/۰۵$ نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن اختلاف نتایج بین دو گروه است.

یافته ها

در این تحقیق، در مجموع ۱۴۶ نفر شامل ۸۶ زن مبتلا به ناباروری و ۶۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی زنان نابارور ۳۵/۲۶±۲/۹ سال و میانگین سنی گروه کنترل ۳۴/۵۲±۳/۲ سال بود. اختلاف معنی‌داری در خصوص سن در دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت(p=۰/۱). به منظور بررسی پلی مورفیسم کدون ۱۰۵، نمونه‌های DNA افراد بیمار و کنترل تحت AS-PCR قرار گرفت. انواع ژنوتیپ‌های مشاهده شده در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که در جدول ۲ آمده، بررسی نتایج نشان داد که در پلی مورفیسم کدون ۱۰۵، از ۸۶ فرد بیمار، ۳۱ نفر (۳۶ درصد) دارای ژنوتیپ CC و ۵۵ نفر (۶۴ درصد) دارای ژنوتیپ CT بودند و هیچ موردی برای ژنوتیپ TT مشاهده نشد. در گروه کنترل نیز از میان ۶۰ فرد سالم، ۲۳ نفر (۳۸/۳ درصد) با ژنوتیپ CC، ۳۵ نفر (۵۸/۳ درصد) با ژنوتیپ CT و ۲ نفر با ژنوتیپ TT مشاهده گردید. جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه فوق از آزمون کای مربع استفاده شد. مقدار χ^2 محاسبه شده برای تفاوت فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده در دو گروه بیمار و کنترل، برابر ۳/۰۹ و مقدار p معادل ۰/۲۱ بود. با توجه به مقدارp می‌توان نتیجه گرفت که ارتباطی بین پلی مورفیسم کدون ۱۰۵ ژن لپتین و ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد. هم‌چنین بررسی فراوانی اللی افراد بیمار و سالم نشان می‌دهد که در افراد بیمار فراوانی آلل T، ۵۵ عدد (۳۲ درصد) و فراوانی آلل C، ۸۶ عدد (۶۸ درصد) و در افراد سالم به ترتیب ۳۷ عدد(۳۳ درصد) و ۵۸ عدد (۶۷ درصد) می‌باشد که با توجه به p=۰/۲ ، تفاوت معنی‌داری بین فراوانی آللی افراد بیمار و سالم مشاهده نمی‌گردد.



شکل ۲. محصولات PCR با پرایمرهای حذف و درج کدون ۱۰۵

فرد ۱ دارای ژنوتیپ هتروزیگوت C/T، فرد ۲ دارای هموزیگوت T/T و فرد ۳ دارای ژنوتیپ هموزیگوت C/C است.
M= مارکر ۵۰bp

جدول ۲. توزیع ژنوتیپی و اللی پلی مورفیسم Arg105Trp ژن لپتین در افراد بیمار و کنترل

	گروه کنترل (۶۰=تعداد)	افراد بیمار (۸۶=تعداد)		P
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	
آلل				
C	۵۸(۶۷/۰)	۸۶(۶۸/۰)	۱/۰۰	(reference)
T	۳۷(۳۳/۰)	۵۵(۳۲/۰)	۰/۱۴(۰/۰۰۶-۳/۲۵)	۰/۲۲۶
ژنوتیپ				
CC	۲۳(۳۸/۳)	۳۱(۳۶/۰)	۱/۰۰(reference)	۰/۲۱۲
CT	۳۵(۵۸/۳)	۵۵(۶۴/۰)	۱/۱۶(۰/۵۸-۲/۳۱)	۰/۶۶۱
TT	۲(۳/۴)	۰(۰/۰)	۰/۱۴(۰/۰۰۶-۳/۲۵)	۰/۲۲۶
TT + CT vs CC	۳۷(۶۴/۵)	۵۵(۶۴/۰)	۱/۱۰(۰/۵۵-۲/۱۸)	۰/۷۷۸
TTvsCC+CT	۵۸(۹۶/۷)	۸۶(۱۰۰)	۰/۱۳(۰/۰۰۶-۲/۸۶)	۰/۱۹۹

بحث

بررسی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در پلی مورفیسم R105W، با توجه به مقادیر χ^2 =۳/۰۹ و p=۰/۲۱ به دست آمده و p=۰/۲ آللی، ارتباط معنی‌داری بین این پلی مورفیسم ژن لپتین و ناباروری زنان در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد.

امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده روحی، اقتصادی و اجتماعی در جوامع بشری محسوب می‌گردد که عامل زن تقریبا نیمی از این مشکل را تشکیل می‌دهد. به طور کلی، در ۳۵ درصد موارد عوامل زنانه، ۳۰ درصد عوامل مردانه، ۲۰ درصد عوامل مرکب از هر دو و در ۱۵ درصد موارد دلایل ناشناخته (ناباروری ایدیوپاتیک) از جمله عوامل دخیل در مشکل ناباروری هستند(۱۶). از این حیث، پرداختن به مقوله ناباروری امری جدی و ضروری می‌نماید.

ژن لپتین در انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ منطقه ۳۱ باند ۳ قرار دارد و حاوی ۳ اگزون و ۲ اینترون می‌باشد. پروتئین حاصل از این ژن، یک پروتئین ترشحی با اندازه ۱۶kDa است(۱۷) و ساختاری شبیه خانواده سایتوکاین کلاس I دارد(۱۸). لپتین در فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی از جمله تولید مثل، عملکرد تیروئید، تراکم استخوان و ایمنی نقش دارد(۱۹). این پروتئین هم‌چنین در عملکرد غدد درون ریز، تنظیم پاسخ ایمنی و التهابی، خونسازی، بهبود زخم، هموستاز انرژی و چاقی و هموستاز گلوکز نیز شرکت می‌کند(۲۰). لپتین در تنظیم عملکرد طبیعی سیستم تولیدمثل زنان شامل تولید شیر، ایجاد فولیکول‌ها، تولید استروئیدهای تخمدانی، حفظ عملکرد و مورفولوژی غدد شیری، رشد و بقای فولیکول‌ها و اووسیت‌ها، بلوغ اندومتر رحم و تنظیم چرخه قاعدگی نقش به سزایی دارد(۲۱).

مطالعات انجام شده بر روی این ژن، نقش تغییرات ژنتیکی آن را در بسیاری از بیماری‌ها نشان داده است. میشل و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند ژن KISS1 که تولید کننده پروتئین کیس پپتین است به عنوان یک ژن سرکوبگر متاستاز انسان توانایی سرکوب متاستاز ملانوسیت و سرطان سینه را دارد(۲۲). اوتساکا و همکاران، در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که استرس عاطفی بر میزان لپتین اثر افزایشی دارد(۲۳). ریولفی و همکاران، در سال ۲۰۱۰ لپتین و رسپتور آن را به عنوان بیومارکرهای مهم در سرطان معرفی کردند(۲۴). جارد و همکاران، در سال ۲۰۰۸ نشان دادند لپتین باعث افزایش اثرات کارسینوژنی و متاستازی سرطان سینه می‌شود(۲۵). کومور و همکاران، در سال ۲۰۰۹ اظهار داشتند که در سرطان کولون، لپتین می‌تواند سرعت رشد سلول‌های سرطانی را افزایش دهد(۲۶). هم‌چنین در سال ۲۰۰۶ ایشیکاوا و همکاران، گزارش کردند که بیان بیش از حد لپتین و رسپتور لپتین می‌تواند در شروع و پیشرفت سرطان معده نقش داشته باشد(۲۷).

در این پژوهش برای نخستین بار به بررسی نقش احتمالی تغییرات ناحیه پلی مورفیک به عنوان یکی از عوامل تاثیر گذار بر ناباروری زنان پرداختیم و برای این منظور تغییرات توزیع ژنوتیپی و آللی این جایگاه را در ۸۶ زن مبتلا به ناباروری و ۶۰ فرد سالم مورد ارزیابی قرار دادیم.

از آنجایی که ناباروری یک بیماری چند عاملی است و تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی قرار دارد، بنابراین نقش سایر ژن‌های دخیل، عوامل محیطی و حتی سایر پلی مورفیسم‌های شناخته شده این ژن، در ایجاد و بروز ناباروری زنان مستلزم تامل و بررسی بیشتراست.

نتیجه‌گیری

ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم Arg105Trp ژن لپتین و ناباروری زنان مشاهده نشد. هرچند نقش ویژگی‌های ژنتیکی افراد در ارتباط پلی مورفیسم و استعداد ابتلا به ناباروری موثر است، اما ممکن است نتایج به دست آمده در جمعیت‌های دیگر به واسطه متفاوت بودن خزانه ژنتیکی جمعیت‌ها و یا تغییر اندازه جمعیت مورد مطالعه تغییر کند. بنابر این حصول نتایج قطعی نیازمند مطالعات با جامعه آماری بیشتری است.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر صمیمانه از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان در فراهم آوردن تجهیزات و همکاری کارکنان بخش ناباروری بیمارستان الزهرا (س) در تهیه نمونه‌ها، مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد زکیه قربانی، دانشجوی رشته ژنتیک پردیس بین الملل دانشگاه گیلان می‌باشد.

منابع

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. Human Reproduction. 2009: dep343.
2. Poongothai J, Gopenath T, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore medical journal. 2009;50(4):336-47.
3. Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. American Journal of Clinical Pathology Pathology Patterns Reviews. 2002; 117(Suppl 1): S95-S103.
4. Haney A. Environmental factors in infertility. Infertility: Springer; 1984. p. 231-45.
5. Frazier CL, San Filippo J, Lambowitz AM, Mills DA. Genetic manipulation of Lactococcus lactis by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. Applied and environmental microbiology. 2003; 69(2):1121-8.
6. Wrann CD, Eguchi J, Bozec A, Xu Z, Mikkelsen T, Gimble J, et al. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. The Journal of clinical investigation. 2012;122(3):1010-1.
7. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. Nature. 2006;444(7121):847-53.
8. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1212(1):97-113.
9. Simopoulou T, Malizos K, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. Osteoarthritis and Cartilage. 2007;15(8):872-83.
10. Margetic S, Gazzola C, Pegg G, Hill R. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity. 2002; 26(11):1407-33.
11. Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2007; 14(6): 458-64.
12. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. Fertility and sterility. 2002;77(3):433-44.
13. Könner AC, Brüning JC. Mapping leptin's link to reproduction. Molecular metabolism. 2012;1(1):5-7.
14. Ichihara S, Yamada Y. Genetic factors for human obesity. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008;65(7-8):1086-98.
15. De Luis D, Perez CJ, Dueñas A. Leptin and obesity. Minerva medica. 2009;100(3):229-36.
16. Healy DL, Trounson AO, Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. The Lancet. 1994;343(8912):1539-44.
17. Henson MC, Castracane VD. Roles and regulation of leptin in reproduction. Leptin: Springer; 2007. p. 149-82.
18. Gruver AL, Sempowski GD. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. Journal of leukocyte biology. 2008; 84(4):915-23.
19. Friedman JM. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. The American journal of clinical nutrition. 2009;89(3):973S-9S.
20. Villanueva EC, Myers M. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. International Journal of Obesity. 2008; 32:S8-S12.
21. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin Antagonizes the Insulin-Like Growth Factor-I Augmentation of Steroidogenesis in Granulosa and Theca Cells of the Human Ovary 1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1999; 84(3): 1072-6.

22. Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M, et al. Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors activator protein-2α and specificity protein-1. Journal of Biological Chemistry. 2006; 281(1):51-8.
23. Otsuka R, Yatsuya H, Tamakoshi K, Matsushita K, Wada K, Toyoshima H. Perceived psychological stress and serum leptin concentrations in Japanese men. Obesity. 2006; 14(10):1832-8.
24. Riolfi M, Ferla R, Valle LD, Piña-Oviedo S, Scolaro L, Micciolo R, et al. Leptin and its receptor are overexpressed in brain tumors and correlate with the degree of malignancy. Brain pathology. 2010; 20(2):481-9.
25. Jardé T, Caldefie-Chézet F, Damez M, Mishellany F, Penault-Llorca F, Guillot J, et al. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. Oncology reports. 2008; 19(4): 905-11.
26. Kumor A, Daniel P, Pietruczuk M, Małecka-Panas E. Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients. International journal of colorectal disease. 2009; 24(3): 275-81.
27. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Expression pattern of leptin and leptin receptor (OB-R) in human gastric cancer. World journal of gastroenterology: WJG. 2006; 12(34):5517-22.