تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

الگوی لیپیدی و سطح لپتین در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک

رسول اسماعیلی
دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

تقی حسن زاده
استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

نویسنده مسئول: رسول اسماعیلی

پست الکترونیک:r.esmaeili@umsha.ac.ir

تلفن: ۰۹۳۹-۱۳۸۰۹۱۲

آدرس: همدان، خیابان شهید فهمیده، روبروی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: *سندرم متابولیک، به مجموعه‌ای از چند اختلال متابولیک گفته می‌شود که با افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی همراه است. تفاوت‌های ژنتیکی ژن گیرنده لپتین با تغییر غلظت و فعالیت لپتین ارتباط داشته و از این‌رو بر روی سطح لیپیدهای سرمی موثر خواهد بود. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط چند شکلی ژن گیرنده لیپتین بر فعالیت لپتین و الگوی لیپیدی در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه مورد - شاهدی ۲۰۰ بیمار مبتلا به سندرم متابولیک و ۲۰۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. قطعات ژنی واجد تغییرات ژنتیکی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر و ژنوتیپ‌های چند شکلی Lys656Asn (K656N) با تکنیک Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) شناسایی گردید. فعالیت لپتین به وسیله کیت و طبق روش استاندارد فلوریمتر و متغیرهای لیپیدی نیز توسط کیت‌های بیوشیمیایی و به روش آنزیمی اندازه گیری شدند.*

یافته ها: *دو گروه از نظر تمامی متغیرهای مورد بررسی نظیر پروفایل لیپیدی، قند خون ناشتا، دور کمر، فشار خون و لپتین با یکدیگر اختلاف معناداری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه گیری: *بین دو گروه شاهد و بیمار از نظر معیارهای خون‌شناسی و بالینی اختلاف معناداری وجود دارد اما چندشکلیK656N نقشی در مشاهده این اختلاف نداشت. در کل چند شکلی Lys656Asn (K656N) ژن گیرنده لپتین با الگوی لیپیدی و فعالیت لپتین در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک ارتباطی ندارد.*

واژه های کلیدی: *سندرم متابولیک، ژن گیرنده لپتین، چند شکلی K656N*

دریافت:۹۲/۶/۲۸
ویرایش‌پایانی:۹۲/۸/۸
پذیرش:۹۲/۸/۱۱

آدرس مقاله:
اسماعیلی ر، حسن زاده ت" الگوی لیپیدی و سطح لپتین در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک " مجله علوم آزمایشگاهی، پاییز ۱۳۹۳، دوره هشتم(شماره۳): ۲۹-۲۳

مقدمه

سندرم متابولیک، به مجموعه‌ای از چند اختلال متابولیک گفته می‌شود از جمله می‌توان به افزایش وزن، افزایش قند خون، چاقی، پرفشاری خون و افزایش چربی های خون اشاره کرد که با افزایش خطر بیماری های قلبی عروقی همراه است (۱،۲). لپتین هورمونی است که در تنظیم مقدار ذخایر چربی بدن نقش کلیدی دارد به طوری که در کنترل میزان دریافت غذا و نحوه مصرف انرژی موثر است(۳). بافت چربی منبع اصلی لپتین می‌باشد. مطالعات نشان داده اند که غلظت پلاسمایی لپتین با توده چربی ارتباط دارد و با کاهش توده چربی سطح لپتین به طور معناداری کاهش می یابد (۴-۶). در برخی مطالعات عنوان شده است که تفاوت‌های ژنتیکی ژن لپتین و گیرنده آن با تغییر غلظت و فعالیت لپتین ارتباط داشته، بنابر این بر روی میزان(high-densitylipoprotein cholesterol)HDL-C،LDL-C(low-density lipoprotein)،(triglyceride)TG،FBS(fasting blood sugar)وBMI (body mass index) اثر دارد (۷-۹). پژوهش‌های قبلی ما نشان داده است که چند شکلی‌های ژن CETP(cholesteryl ester transfer protein) و لپتین می تواند تغییراتی را در پروفایل لیپیدی، فعالیت و غلظت CETP و لپتین ایجاد کند و باعث افزایش چربی خون و سندرم متابولیک می‌شوند (۱۰-۱۴). مطالعات مختلفی بر روی چند شکلی های ژن گیرنده لپتین انجام شده است که از جمله آنها می توان به چند شکلی Gln 223 Arg اشاره کرد. نتایج مطالعه ای روی ژنوتیپ های این چند شکلی در تنظیم سطح لپتین سرمی موثر می باشد و به عنوان عامل مستعد کننده برای ایجاد بیماری های متابولیکی گزارش شد (۱۵). در برخی مطالعات دیگر تفاوت معناداری بین این چند شکلی با سطح لپتین و بیماری های مورد پژوهش یافت نشده است (۱۶-۱۸). از آنجایی‌که میزان HDL-C، LDL-C و افزایش توده چربی بدن از عوامل مهم بیماری سندرم متابولیک می‌باشد، بنابراین احتمالا چندشکلی‌های ژن گیرنده لپتین می‌تواند نقش مهمی در بیماری زایی سندرم متابولیک داشته باشد. چندشکلی Lys656Asn (K656N) ژن گیرنده لپتین در مناطق مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته و نتایج متفاوتی را نشان داده است. در این مطالعه تاثیر چند شکلی Lys656Asn (K656N) ژن گیرنده لپتین بر فعالیت لپتین و الگوی لیپیدی در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی ۲۰۰ بیمار(۱۴۲ زن و ۵۸ مرد) با میانگین سنی ۱۳/۵±۴۴/۳ و ۲۰۰ شاهد(۱۲۲ زن و۷۸ مرد) با میانگین سنی ۱۲/۵±۳۷ مراجعه کننده به مطب متخصص غدد در شهر همدان از آبان ماه سال ۱۳۸۸ تا مهر ماه سال ۱۳۸۹ انتخاب گردیدند. افراد مبتلا به بیماری‌های کبدی، کلیوی، تیروئیدی و خانم‌های باردار و افراد مصرف‌کننده داروهای کاهنده چربی خون از این مطالعه خارج شدند. از هر فرد مورد مطالعه ۵ میلی لیتر خون وریدی در شرایط ناشتا گرفته شد که ۱ میلی لیتر از آن را در لوله‌های حاوی EDTA و بقیه خون در لوله‌های آزمایش بدون ماده ضد انعقاد ریخته شد. گلوکز، کلسترول وزی گلییرد به روش آنزیمی-رنگ سنجی، HDL-C به روش رنگ سنجی مستقیم و لپتین به روش الایزا و با استفاده از کیت اندازه گیری شدند. استخراج *DNA* ژنومی از خون تام با استفاده از کیت (شرکت سیناژن) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت *DNA* و تعیین میزان خلوص آن با استفاده از اسپکتروفتومتر مورد سنجش قرار گرفت. قطعات ژنی واجد تغییرات ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند و با روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) تعیین ژنوتیپ شدند. چندشکلی K656N از جایگزین شدن باز C با G در کدون۶۵۶ در گیرنده لپتین ایجاد می‌گردد. این قطعه در حالت طبیعی فاقد محل اثر برای آنزیم محدودساز است و در صورت وجود جهش هموزیگوت و در اثر آنزیم دو قطعه ۳۱و ۴۷ جفت بازی ایجاد می شد. علاوه بر این دو نوع ژنوتیپ در صورت هتروزیگوت بودن این ژن ۳ قطعه۳۱و۴۷و۷۸ جفت بازی مشاهده خواهد شد. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه موجود

در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی به کار گرفته شده برای تکثیر قطعه واجد چند شکلی *K656N* به صورت زیر بود: مخلوط واکنش به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد گرم شد تا دو رشته *DNA* از هم جدا شوند. سپس ۳۵ چرخه برنامه تغییرات دمایی زیر تکرار گردید: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد جهت واسرشته سازی دو رشته *DNA* (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرها به *DNA* (Annealing) و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای طویل شدن(Extension)پس از اتمام ۳۵ چرخه، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد گرم شده تا عمل طویل شدن نهایی انجام گردد. توالی پرایمر های R و F لازم جهت تکثیر قطعه *DNA* دارای چند شکلی *K656N* عبارت بود از(۹):

Forward: 5' –agg acc tga att ttg gag aa -3'
Revers: 5' –agg ggc ttc caa agt aaa gtg aca ttt ttc gc - 3'

برای انجام تجزیه و تحلیل آماری از برنامهSPSS-۱۳ استفاده گردید. تفاوت های آماری بین متغیرهای سرمی با استفاده از آزمون Independent Sample T-Test محاسبه شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار متغیرهای موردمطالعه دو گروه شاهد و بیمار

ویژگی	گروه	گروه کنترل N=۲۰۰	گروه بیمار N=۲۰۰	P- Value
BMI (کیلوگرم / متر مربع)		۲۶/۸±۵/۸	۳۰/۵±۵/۷	<۰/۰۵
دور کمر(سانتی متر)		۹۰/۵±۱۴/۸	۱۰۰/۸±۱۱	<۰/۰۵
فشارخون سیستولیک(mmHg)		۱۱/۵±۱/۴	۱۲/۷±۱/۸	<۰/۰۵
فشار خون دیاستولیک(mmHg)		۷/۷±۰/۸	۸/۳±۱/۱	<۰/۰۵
قند خون (میلی گرم / دسی لیتر)		۸۹/۵±۱۳/۴	۱۰۵/۳±۳۶/۳	<۰/۰۵
کلسترول (میلی گرم / دسی لیتر)		۱۷۷/۶±۳۳/۳	۲۰۲±۴۲	<۰/۰۵
تری گلیسرید (میلی گرم / دسی لیتر)		۱۲۹±۴۸	۱۹۴/۹±۸۰/۸	<۰/۰۵
HDL-C (میلی گرم / دسی لیتر)		۴۶/۵±۸/۳	۴۱/۶±۱۰/۵	<۰/۰۵
LDL-C (میلی گرم / دسی لیتر)		۱۰۲/۴±۳۰/۵	۱۲۳±۳۵/۵	<۰/۰۵
لپتین (نانوگرم / میلی‌لیتر)		۱۰/۳±۸/۳	۱۹/۴±۱۵	۰/۰۰۱

یافته ها

مقایسه خصوصیات بالینی و بیوشیمیایی در دو گروه نشان داد که دو گروه از نظر تمامی خصوصیات ذکر شده با یکدیگر اختلاف معناداری دارند. به طوری که در گروه بیماران مبتلا به سندرم متابولیک غلظت سرمی تری گلیسرید ، کلسترول تام (TC)، LDL- C ، HDL - Cو FBS به طور معناداری بالاتر از گروه شاهد می‌باشد (جدول۱). میانگین غلظت لپتین سرمی در گروه کنترل ۱۰/۳±۸/۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر و در گروه بیمار۱۹/۴±۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده که در گروه بیمار به طور معناداری بالاتر از گروه شاهد است (P=۰/۰۰۱) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ای به طول ۷۸ جفت باز در ناحیه اگزون شماره ۶ گیرنده لپتین تکثیر گردید. پس از انجام مرحله هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم AccII هیچ گونه شکستی در قطعات حاصل از PCR صورت نگرفت و در واقع در دو گروه مورد مطالعه چند شکلی مورد نظر مشاهده نشد. از آنجا که چند شکلی مورد نظر در دو گروه یافت نشد لذا امکان مقایسه تاثیر ژنوتیپ های این چند شکلی با عوامل مورد بررسی وجود نداشت.

بحث

در دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای بر نقش‌های مختلف لپتین و اثرات آن بر احتمال ایجاد یا تشدید بیمارهایی مانند چاقی، دیابت، سندرم متابولیک، بیماری‌های انسدادی ریوی، تراکم استخوان و غیره صورت گرفت (۱۹-۲۲). در برخی مطالعات افزایش قابل توجه سطح لپتین سرمی در افراد چاق و سندرم متابولیک به همراه هورمون‌های دیگری مانند انسولین، آدیپونکتین، آنژیوتانسینوژن-۲گزارش شده است (۹،۲۳). همچنین اثر لپتین، هموسیستئین و فاکتور رشد مشابه انسولین

به همراه سایر هورمون‌های استروژنی براحتمال بیماری سندرم پلی کیستیک تخمدان (PCOS) بررسی شده است (۲۴،۲۵). با توجه به اینکه غلظت لپتین سرمی تحت تاثیر سایر هورمون‌ها و شرایط متابولیکی بدن می‌باشد بهترین شیوه مطالعه اثرات آن بر بیماری‌ها بررسی‌های ژنتیکی و تشخیص جهش‌ها و جهش‌های موجود در جایگاه ژنی لپتین و گیرنده آن می‌باشد. تاکنون مطالعات بسیاری در ارتباط با جهش های این هورمون صورت گرفته اما با وجود نتایج متناقض و تفاوت جمعیت‌های مورد مطالعه همواره نیاز به انجام تحقیقات بیشتر دارد. مطالعه‌ای در یک جمعیت شهری بر روی ۱۰۳۶۷ نفر در شهر تهران صورت گرفته است که در این میان حدود ۳۰ درصد بیمار گزارش شده اند و مشخص گردید که شیوع این بیماری در بین زنان بالاتر از مردان است (۲۶). در مطالعه دیگری در شهر مشهد بر روی چند شکلی ژن گیرنده آنژیوتانسین ۲ نتایج جالب توجه‌ای در ارتباط با این چند شکلی و افزایش احتمال ابتلا به بیماری سندرم متابولیک بدست آمده است (۹). در مطالعه حاضر دو گروه کنترل و بیمار از نظر تمام متغیرهای مورد بررسی مانند قند خون ناشتا، کلسترول، تری‌گلیسرید، فشار خون، دورکمر، HDL-C،LDL-C و BMI اختلاف معناداری داشته و در همه موارد افزایش قابل توجه ای در گروه بیمار دیده شد. غلظت لپتین به طور معناداری در گروه بیمار بیشتر بود ولی چند شکلی مورد نظر در هیچ کدام از دو گروه دیده نشد که نشان دهنده عدم ارتباط این چند شکلی با بیماری سندرم متابولیک در جمعیت مورد مطالعه دارد. نتایج مطالعات مختلف در مورد تفاوت دو گروه از نظر کلیه فاکتورهای مورد بررسی مشابه نتایج ما می باشد همچنین غلظت لپتین نیز با سایر مطالعات همخوانی دارد و همگی تفاوت معناداری را بین دو گروه گزارش کرده اند (۲۸،۲۷،۱۷،۱۶) بین ارتباط ژنوتیپ های این چند شکلی با متغیرهای مورد بررسی نتایج متناقضی ارائه شده است. در یک مطالعه مروری در سال ۲۰۰۲ به بررسی مطالعات قبلی بر روی چند شکلی های مختلف ژن گیرنده لپتین در آفریقا، آمریکا، قفقاز، دانمارک، فنلاند، فرانسه و نیجریه پرداخته شد. در نهایت نتیجه گرفتند که با وجود هتروژنیسیته بودن نتایج این چند شکلی ها در افراد مختلف و وجود ژنوتیپ خاصی در جمعیت‌های ویژه، رابطه معناداری بین این چند شکلی و احتمال بروز بیماری‌ها وجود ندارد (۲۷).Okada و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای بر روی کودکان چاق ژاپنی دریافتند که بین چند شکلی K656N گیرنده لپتین و الگوی لیپیدی در بیماران و افراد کنترل اختلاف معناداری وجود ندارد (۱۶) که می تواند تایید کننده نتایج این مطالعه باشد.Saukko و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر چند شکلی K656N گیرنده لپتین بر افزایش خطر ابتلا به آترواسکلروز را بر روی افراد میانسال بررسی کردند و نشان دادند که هیچ گونه ارتباطی بین گونه های ژنتیکی مختلف وجود ندارد(۱۷). Wiedemann و همکاران نیز گزارش کردند که ارتباطی بین چند شکلی K656N گیرنده لپتین و افزایش فشارخون در زنان باردار وجود ندارد (۱۸). De Luis و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی بین ژنوتیپ های مختلف چند شکلی K656N و سندرم متابولیک در بیماران چاق با سندرم متابولیک ارتباطی را مشاهده نکردند (۲۸). ولی در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۲ بین چند شکلی K656N و پارامترهای چاقی، مقاومت به انسولین و سطح گلوکز در بیماران با کبد چرب غیر الکلی ارتباط قابل توجه-ای گزارش کرد (۲۹). علت این تفاوت‌ها و شباهت‌ها کاملا مشخص نیست ولی شاید بتوان این نتایج گوناگون را ناشی از تاثیرات منطقه‌ای، نژادی، قومیتی، شیوه‌زندگی، رژیم‌های غذایی متفاوت، بیماری‌های ژنتیکی خاص، شرایط فیزیولوژیک و روانی ویژه، تفاوت در حجم و انتخاب نمونه ها دانست.

نتیجه‌گیری

بین دو گروه مورد مطالعه سالم و بیمار مبتلا به سندرم متابولیک از نظر معیارهای خون‌شناسی و بالینی اختلاف معناداری وجود دارد، اما چند شکلی K656N نقشی در مشاهده این اختلاف نداشت. در کل چند شکلی Lys656Asn (K656N) ژن گیرنده لپتین با الگوی لیپیدی و فعالیت لپتین در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک ارتباطی ندارد.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر از مساعدت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان در تصویب و تامین هزینه ایـن طـرح مصوبه سال ۱۳۹۰ و کد ۱۶/۳۵/۳۵۷۱/پ/د، از کارکنان محترم مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان به جهت همکاری در انجام آزمایشات قدردانی می‌گردد.

References

1.Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, et al. *Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study*. Circulation. 2003; 108(4): 414-419.

2.Scuteri A, Najjar SS, Morrell CH, Lakatta EG. *Cardiovascular Health Study: The metabolic syndrome in older individuals: prevalence and prediction of cardiovascular events: the Cardiovascular Health Study.* Diabetes Care. 2005; 28(4): 882-887.

3.Jéquier E. *Leptin signaling, adiposity, and energy balance*. Ann N Y Acad Sci. 2002; 967: 379-388.

4.Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. *A novel leptin receptor isoform in rat*. FEBS Letters. 1996; 392(2): 87-90.

5.Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. *Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(13): 6231-6235.

6.Sandowski Y, Raver N, Gussakovsky EE, Shochat S, Dym O, Livnah O, et al. *Subcloning, expression, purification, and characterization of recombinant human leptin-binding domain*. The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(48): 46304-46309.

7.Wabitsch M, Blum WF, Muche R, Braun M, Hube F, Rascher W, et al. *Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents*. The Journal of Clinical Investigation. 1997; 100(4): 808-813.

8.Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. *Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress*. Endocrinology. 1997; 138(9): 3859-3863.

8.Alavi-Shahri J, Behravan J, Hassany M, Tatari F, Kasaian J, Ganjali R, et al. *Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and metabolic syndrome in a young female Iranian population*. Archives of Medical Research. 2010; 41(5): 343-349.

9. Ghasabeh TH, Firoozrai M, Zonouz AE, Radmehr H, Zavarehee A, Paoli M. *One common polymorphism of cholesteryl ester transfer protein gene in Iranian subjects with and without primary hypertriglyceridemia.* Pak J Biol Sci. 2007; 10(23): 4224-4229.

10.Ghasabeh TH, Firoozrai M, Zonouz AE, Paoli M. *Association between cholesteryl ester transfer protein Taq1B polymorphism with lipid levels in primary hyperlipidemic patients*. Eur J Lipid Sci Technol. 2008; 110:25–231.

11.Hassanzadeh T, Firoozrai M, Zonouz AE, Zavarehee A, Paoli M. Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in primary combined hyperlipidaemia. *The Indian Journal of Medical Research*. 2009; 129(3): 293-298.

12.Barkhordari A, Hassanzadeh T, Saidijam M, Esmaeili R, Paoli M. *Association between cholestryl ester transfer protein D442G polymorphism on serum lipid levels and CETP activity in hypercholesterolemic patients*. Tehran University Medical Journal. 2012; 69(12): 737-743.[Persian]

13.Akbarzadeh M, Hassanzadeh T, Saidijam M, Esmaeili R, Borzouei Sh, Hajilooi M. *Cholesteryl ester transfer protein (CETP) -629C/A polymorphism and it(,)s effects on the serum lipid levels in metabolic syndrome patients*. Molecular Biology Reports. 2012; 39(10): 9529-9534.

14.Constantin A, Costache G, Sima AV, Glavce CS, Vladica M, Popov DL. *Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects*. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 391(1): 282-6.

15.Okada T, Ohzeki T, Nakagawa Y, Sugihara S, Arisaka O, Study Group of Pediatric Obesity and Its related Metabolism. *Impact of leptin and leptin-receptor gene polymorphisms on serum lipids in Japanese obese children*. Acta Pediatrica. 2010; 99(8): 1213-1217.

16.Saukko M, Kesäniemi YA, Ukkola O. *Leptin receptor Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with early atherosclerosis*. Metab Syndr Relat Disord. 2010; 8(5): 425-430.

17.Wiedemann A, Vocke F, Fitzgerald JS, Markert UR, Jeschke U, Lohse P, et al. *Leptin gene (TTTC)(n) microsatellite polymorphism as well as leptin receptor R223Q and PPARgamma2 P12A substitutions are not associated with hypertensive disorders in pregnancy*. American Journal of Reproductive Immunology. 2010; 63(4): 310-317.

18. Hansel NN, Gao L, Rafaels NM, Mathias RA, Neptune ER, Tankersley C, et al. *Leptin receptor polymorphisms and lung function decline in COPD.* The European Respiratory Journal. 2009; 34(1): 103-110.

19. Ye XW, Xiao M, Ye J, Zhang XY, Xiao J, Feng YL. *The polymorphism -2548G/A in leptin and severity of chronic obstructive pulmonary disease*. International Journal of Immunogenetics. 2011; 38(1): 45-50.

20.Kim SM, Kim SH, Lee JR, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. *Association of leptin receptor polymorphisms Lys109Arg and Gln223Arg with serum leptin profile and bone mineral density in Korean women*. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 2008; 198(4): 421-428.

21.Andersen PH, Kristensen K, Pedersen SB, Hjøllund E, Schmitz O, Richelsen B. *Effects of long-term total fasting and insulin on ob gene expression in obese patients*. European Journal of Endocrinology. 1997; 137(3): 229-233.

22.Abdullah AR, Hasan HA, Raigangar VL. *Analysis of the relationship of leptin, high-sensitivity C-reactive protein, adiponectin, insulin, and uric acid to metabolic syndrome in lean, overweight, and obese young females*. Metabolic Syndrome and Related Disorders. 2009; 7(1): 17-22.

23.Atamer A, Demir B, Bayhan G, Atamer Y, Ilhan N, Akkuş Z. *Serum levels of leptin and homocysteine in women with polycystic ovary syndrome and its relationship to endocrine, clinical and metabolic parameters*. The Journal of International Medical Research. 2008; 36(1): 96-105.

24.Kedikova SE, Sirakov MM, Boyadzhieva MV. *Leptin levels and adipose tissue percentage in adolescents with polycystic Ovary Syndrome*. *Gynecological* Endocrinology. 2013; 29(4): 384-387.

25.Azizi F, Salehi P, Etemadi A, Zahedi-Asl S. *Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study*. Diabetes Research and Clinical Practice. 2003; 61(1): 29-37.

26.Heo M, Leibel RL, Fontaine KR, Boyer BB, Chung WK, Koulu M, et al. *A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference.* International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. 2002; 26(5): 640-646.

27.De Luis DA, Gonzalez Sagrado M, Aller R, Izaola O, Conde R, Castro MJ. *Lys656Asn polymorphism of leptin receptor gene and metabolic syndrome in obese patients.* European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2011; 15(5): 463-468.

28.Aller R, De Luis DA, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Pacheco D. *Lys656Asn polymorphism of leptin receptor, leptin levels and insulin resistance in patients with non alcoholic fatty liver disease.* European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2012; 16(3): 335-341.