

Original Article

Relationship between Fas gene polymorphism and idiopathic male infertility

Rofeydeh Ali Askari Eshiani¹, Farhad Mashayekhi^{1*}, Mohammad Hadi Bahadori²

¹Department of Biology, School of Science, Guilan University, Rasht, Iran

²School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

*Corresponding author; E-mail: mashayekhi@guilan.ac.ir

Received: 14 March 2015 Accepted: 25 April 2015 First Published online: 11 October 2017

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 December;39(5):43-48

Abstract

Background: Infertility is defined as the inability to achieve pregnancy after one year of unprotected intercourse. A large proportion of infertile men fail to impregnate their female counterpart due to lack of sperm (azoospermia) or too little sperm (oligozoospermia). Infertility may also be due to estrogens, infections, heavy metals, cigarette smoking, reactive oxygen species (ROS) and sperm antibodies. Fas is a member of the TNFR (tumor necrosis factor receptor) family that is widely expressed on the surface of many different kinds of cells. Fas gene is involved in the apoptosis process. The purpose of this study was to evaluate the effect of Fas gene polymorphism in male infertility in a population in north of Iran.

Methods: This study involved 132 patients with male infertility and 102 healthy controls. DNA samples were extracted from the peripheral blood and genotyped by RFLP-PCR method. Statistical analysis was performed using MedCalc.

Results: The frequencies of AA, AG, GG in patients were 31.81%, 54.54% and 13.63%, respectively and in controls were 45.09%, 47.05%, 7.84%, respectively.

Conclusion: It is concluded that there is no significant association between Fas-670A/G gene polymorphism and male infertility ($p=0.07$). Further studies with larger numbers of patients are required to elucidate the potential role of Fas gene polymorphism in male infertility.

Keywords: Polymorphism, Fas, Male Infertility

How to cite this article: Ali Askari Eshiani R, Mashayekhi F*, Bahadori M.H. [Relationship between Fas gene polymorphism and idiopathic male infertility]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 December;39(5):43-48. Persian.

مقاله پژوهشی

ارتباط پلی مورفیسم ژن Fas و ناباروری ایدیوپاتیک مردان

رفیده علی عسکری اشینی^۱، فرهاد مشایخی^{۱*}، محمد هادی بهادری^۲^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران^۲دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

* نویسنده رابط؛ ایمیل: mashayekhi@guilan.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۵ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۷/۱۹

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۶؛ ۳۹(۵): ۴۳-۴۸

چکیده

زمینه: ناباروری به معنی ناتوانی در باروری بعد از یکسال آمیزش محافظت نشده است. بخش بزرگی از جمعیت مردان نابارور موفق به باردار کردن زن خود به دلیل آژواسپرمی (فقدان اسپرم) یا الیگواسپرمی (میزان اسپرم کم) نمی شوند. ناباروری در مردان ممکن است در اثر استروژن و مشتقات آن، عفونت ها، فلزات سنگین، سیگار کشیدن، گونه های فعال اکسیژن، آنتی بادی ضد اسپرم ایجاد شود. Fas یک عضو از خانواده TNFR (گیرنده فاکتور نکروز توموری) است که در سطح سلول های مختلف بیان می شود. ژن Fas در فرایند آپاتوزیس نقش دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثر پلی مورفیسم ژن Fas بر ناباروری مردان در جمعیت شمال ایران است.

روش کار: در این مطالعه از ۱۳۲ مرد نابارور و ۱۰۲ فرد سالم استفاده شد. DNA از نمونه های خون استخراج شد و سپس بررسی ژنوتیپ ها توسط روش PCR-RFLP صورت گرفت. آنالیز آماری توسط MedCalc انجام شد.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپ AA /AG /GG در گروه بیمار به ترتیب برابر ۳۱/۸۱ درصد و ۵۴/۵۴ درصد و ۱۳/۶۳ درصد و در نمونه های کنترل به ترتیب برابر ۴۵/۰۹ درصد و ۴۷/۰۵ و ۷/۸۴ درصد بود.

نتیجه گیری: مطالعه انجام شده ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم ژن Fas-670 A/G و ناباروری ایدیوپاتیک مردان نشان نمی دهد (P=۰/۰۷). مطالعات دیگری با تعداد بیشتری از بیماران جهت نشان دادن نقش پلی مورفیسم ژن Fas مورد نیاز است.

کلید واژه ها: پلی مورفیسم، Fas، ناباروری مردان

نحوه استناد به این مقاله: علی عسکری اشینی ر، مشایخی ف، بهادری م. ارتباط پلی مورفیسم ژن Fas و ناباروری ایدیوپاتیک مردان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۵): ۴۳-۴۸

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

ناباروری اختلالی است که در ۱۵ درصد زوج‌های جهان دیده می‌شود. تعریف پذیرفته شده برای ناباروری، عدم موفقیت در حاملگی پس از ۱ سال آمیزش حفاظت نشده و منظم است (۱). عوامل ایجاد کننده ناباروری می‌تواند مربوط به زن یا مرد یا هر دو باشد. حدود ۴۰ درصد از مشکلات ناباروری مربوط به مردان و ۴۰ درصد مربوط به زنان است. در ۲۰ درصد از زوج‌ها نیز عامل ناباروری مشخص نیست. فرایند باروری در مردان شامل تولید اسپرم بالغ و فراهم کردن شرایط رسیدن آن به تخمک و بارورسازی آن است (۲). اسپرماتوزن فرایندی است که در بیضه‌ها و اپیدیدیم مرد بالغ رخ داده و طی آن سلول جنسی نر تکثیر شده و به اسپرم بالغ تبدیل می‌شود (۳). در اسپرماتوزن سلول‌های مختلفی شامل سلول‌های زایای اسپرم، سلول سرتولی، لیدیک و ماکروفاژ دخالت دارند. از جمله فرایندهای مهم در اسپرماتوزن آپاتوزیس است. آپاتوزیس سلول‌های زایای بیضه برای اسپرماتوزن و حفظ هموستازی بیضه ضروری است (۴). آپاتوزیس یک فرایند طبیعی و یک برنامه ژنتیکی است که باعث مرگ برنامه ریزی شده سلول شده و برای تکوین و عملکرد موجود زنده ضروری است. آپاتوزیس می‌تواند به صورت دو مسیر داخلی و خارجی فعال شده و باعث مرگ سلولی شود (۵ و ۶).

(Fas Stimulating Fragment, poptosisA Fas) یک پروتئین گیرنده سطح سلول است. Fas پروتئین تراغشایی نوع ۱ است و با اتصال به لیگاند طبیعی خود FasL که پروتئین تراغشایی نوع ۲ است پیام مرگ را منتقل می‌کند و می‌تواند به وسیله فعالیت متالوپروتئینازها به فرم محلول تبدیل شود. سیستم Fas تنظیم کننده کلیدی در آپاتوز سلول جنسی است. Fas و FasL توسط سلول‌های جنسی و سرتولی بیان می‌شوند و این پاسخ به شرایط محیطی نامناسب دچار مرگ برنامه ریزی شده می‌شوند (۷ و ۸). ساختار عملکردی در Fas مربوط به دومین مرگ است. دومین مرگ در Fas از ۶ زیرواحد آلفا هلیکس تشکیل شده است. هلیکس ۳ به دومین FADD در محل شروع انتقال سیگنال متصل است (۹).

پروتئین بالغ Fas شامل ۳۱۹ آمینواسید با ۳ دومین و وزن ۴۸ کیلو دالتون است که این دومین‌ها شامل دومین خارج سلولی، دومین تراغشایی و دومین داخل سیتوپلاسمی می‌باشد.

جایگاه خارج سلولی از ۱۵۷ آمینواسید تشکیل شده و غنی از باقیمانده سیستئین است. جایگاه تراغشایی شامل ۱۷ آمینواسید بلند است و جایگاه داخل سیتوپلاسمی از ۱۴۵ آمینواسید بلند تشکیل شده است (۱۰).

اشکال مختلف یک ژن که حاوی توالی‌های متفاوت هستند، به عنوان آلل شناخته می‌شوند. به وجود آلل‌های مختلف یک ژن در جمعیت یک گونه که ممکن است باعث ایجاد فنوتیپ‌های مختلف شود و فراوانی آن آلل در جمعیت ۱ درصد و یا بیشتر باشد پلی‌مورفیسم یا چند شکلی گویند (۱۱). دو پلی‌مورفیسم در ناحیه‌ی پروموتور ژن Fas شناسایی شده است که یکی در ناحیه کاهنده (Silencer) است که دارای جایگزینی نوکلئوتید G به A (A/G) در موقعیت ۱۳۷۷- (rs۲۲۳۴۷۶۷) است و دیگری در ناحیه تقویت کننده (Enhancer) است که دارای جایگزینی A به G (G/A) در موقعیت نوکلئوتید ۶۷۰- (rs۱۸۰۰۶۸۳) است (۶).

با توجه به اهمیت درک علل ناباروری و همچنین نقش Fas در مرگ سلول‌های معیوب در دستگاه تولید مثل نر، در این تحقیق به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم مربوط به ژن Fas در موقعیت ۶۷۰ G/A - و خطر ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک در مردان پرداخته شد. ناباروری در مردان یک فرایند پیچیده است که ۱۰ - ۱۵ زوج‌های جهان به آن مبتلا هستند. از این میان ۴۰ درصد مشکلات ناباروری مربوط به مردان است. از هر ۱۰ نفر ۱ نفر مبتلا به ناباروری اولیه یا ثانویه است. مطالعات نشان می‌دهد که آپاتوز سلول جنسی یک فرایند مهم در اسپرماتوزن است. آپاتوز ناقص و ناکافی باعث نقص در اسپرماتوزن می‌شود. سیستم Fas/ FasL به عنوان سیستم کلیدی در تنظیم آپاتوز است. به همین دلیل بررسی پلی-مورفیسم‌های ژنتیکی ژن Fas بسیار اهمیت دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم مربوط به ژن Fas در موقعیت (G/A -670) و خطر ابتلا به ناباروری ایدیوپاتیک در مردان می‌باشد.

روش کار

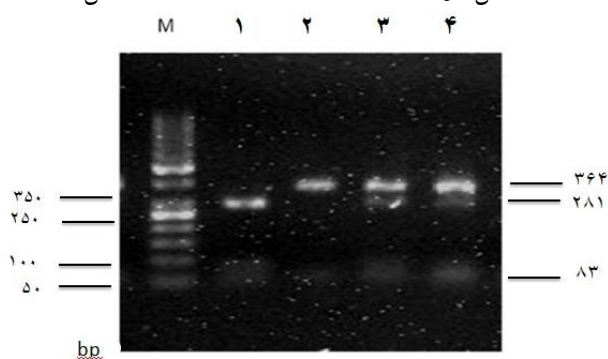
در این مطالعه علمی پژوهشی در مجموع ۲۳۴ مرد در جمعیت گیلان مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند که از این تعداد ۱۰۲ مرد به عنوان نمونه‌های سالم و کنترل انتخاب شدند. در این پژوهش به رعایت نکات اخلاقی ازجمله آگاهی و رضایت بیمار نسبت به انجام آزمایش توجه شده است. نمونه‌های مورد تحقیق توسط بیمارستان رازی و تحت نظر پزشک متخصص و با رضایت بیمار تهیه شده است. گروه کنترل دارای حداقل یک فرزند زیر ۵ سال بودند. از این میان ۱۳۲ مرد که به علت مختلفی دچار ناباروری بودند توسط پزشک متخصص به عنوان افراد بیمار در نظر گرفته شدند. دامنه سنی افراد سالم بین ۴۰-۲۵ سال و افراد نابارور بین

الکتروفورز شدند و ژل آگارز در دستگاه Gel Doc تصویر برداری شد.

در این تحقیق با استفاده از نرم افزار MedCalc (version 12.1.4) آزمون‌های آماری χ^2 (chi-square) انجام شد و همچنین پارامترهایی مانند P-value تعیین گردید و $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در ابتدا از نمونه‌های خون DNA استخراج گردید و برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز افقی استفاده شد. در ادامه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) انجام شد. در این واکنش از پرایمر Reverse و Forward که قطعه ای به طول ۳۶۴ از ژن Fas را تکثیر می‌کند برای بررسی پلی مورفیسم ژن Fas استفاده شد. در مرحله بعد برای بررسی ژنوتیپ مربوط به نمونه‌ها و فراوانی پلی مورفیسم ژن Fas از آنزیم اختصاصی PfoI و روش PCR-RFLP استفاده شد و قطعات حاصل در دستگاه Doc Gel مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: نتایج حاصل از هضم آنزیمی در گروه بیمار: در این شکل چاهک M دارای مارکر با وزن مولکولی ۵۰ bp است. ردیف ۱ دارای قطعه‌ای به طول ۳۶۴ و ۲۸۱ bp است که نشان دهنده ژنوتیپ GG است. ردیف ۲ دارای قطعه ۳۶۴ و ۲۸۱ bp و ردیف ۳ و ۴ دارای قطعه‌ی ۳۶۴ و ۲۸۱ و ۸۳ است که به ترتیب نشان دهنده وجود ژنوتیپ AA و AG است.

فراوانی الی و ژنوتیپی به ترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: فراوانی الی مربوط به Fas در مردان کنترل (n= ۱۰۲)

ال	کنترل	بیمار	χ^2	P-value
A	۰/۶۹	۰/۵۹	۱/۷۵۸	۰/۱
G	۰/۳۱	۰/۴۱		

در این مطالعه از نظر توزیع الی و ژنوتیپی پلی مورفیسم ژن Fas - ۶۷۰ A/G

۴۵-۲۴ سال است. نمونه‌های مورد مطالعه مبتلا به آزواسپرمی و الیگواسپرمی هستند.

در ابتدا نمونه‌های خونی از هر دو گروه سالم و بیمار تهیه شد. سپس توسط کیت Gpp solution (محصول شرکت Cinna Gene)، DNA از نمونه‌های خون افراد سالم و نابارور استخراج گردید. برای بررسی کیفیت DNA و همچنین انجام صحیح مراحل استخراج آن از روش الکتروفورز افقی (پارس پژوهش پایا) استفاده شد و تصاویر تهیه گردید. پس از بررسی و مشاهده کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌ها به صورت تصویر حاصل از ژل آگارز، واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) صورت گرفت. در این واکنش ۱۰ ML mix ۲ X ۱۰ ML، ۵ ml آب، ۱ ML پرایمر رو به جلو (forward) و ۱ ML رو به عقب (reverse) (محصول شرکت Cinna Gene) که قطعه ای به طول ۳۶۴ bp از ژن Fas را تکثیر می‌کند به منظور بررسی وجود و عدم وجود پلی مورفیسم ژن Fas استفاده شد.

پرایمرهای مربوط به ژن Fas با استفاده از نرم-افزار 7.56Oligo طراحی شد و از شرکت پارس مهر زیست خریداری شد.

توالی پرایمرهای Forward و Reverse مربوط به ژن Fas:

پرایمر Reverse

5'TCACTCAGAGAAAGACTTGCG3'

پرایمر Forward

5'TCACTCAGAGAAAGACTTGCG3'

پس از انجام واکنش PCR بررسی ژنوتیپ‌های مربوط به نمونه‌ها و فراوانی پلی مورفیسم مربوط به ژن Fas از آنزیم اختصاصی PfoI و روش PCR-RFLP استفاده شد. در ابتدا محلولی حاوی ۴/۰۷ ml آب و ۰/۳ ML آنزیم، ۱ ML بافر (محصول شرکت Fermentase) و ۴ ML محصول RPC ساخته شد و برای یافتن زمان مناسب برای فعالیت آنزیم، یک محصول PCR در چند زمان مختلف در حمام آب قرار داده شد. برای این منظور ۶ LM از محلول درون میکروتیوپ ۰/۲ ریخته شد و سپس ۴ LM از محصول PCR به آن افزوده و درون حمام آب قرار داده شد. در ادامه یک نمونه در ساعت-های متوالی از ۲ ساعت تا ۶ ساعت در حمام آب قرار داده شد و بهترین زمان برای فعالیت آنزیم بدست آمد. در ادامه برای همه نمونه‌ها، ۶ LM از محلول و ۴ LM از محصول PCR درون میکروتیوپ ۰/۲ ریخته شد و در حمام آب قرار داده شد. سپس ژل الکتروفورز انجام شد و تصویر مربوط به ژنوتیپ هر نمونه در Gel Doc مشاهده شد. سپس محصولات آنزیم جهت بررسی وجود و عدم وجود پلی مورفیسم ژن Fas در موقعیت ۶۷۰- که پورین G جایگزین پورین A شده است

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپ مربوط به Fas در مردان کنترل و بیمار (n=۱۳۲)

ژنوتیپ	کنترل n(%)	بیمار n(%)	χ ^۲	P-value
AA	۴۶(۴۵/۱۰٪)	۴۲(۳۱/۸۱٪)	۵/۰۶۵	۰/۰۷
AG	۴۸(۴۷/۱۰٪)	۷۲(۵۴/۵۵٪)	-	-
GG	۸(۷/۸۰٪)	۱۸(۱۳/۶۴٪)	-	-

S اختلاف معنی داری بین گروه مردان نابارور و افراد کنترل وجود نداشت.

بحث

ناباروری یک مشکل جهانی است که ۱۵-۱۰ درصد جمعیت جهان را شامل می شود (۱۲). شیوع ناباروری در کشورهای در حال توسعه بیشتر است (۱۳). فراوانی ناباروری اولیه بین ۸-۱ درصد و ناباروری ثانویه ۳۵ درصد است (۱۳). عوامل مختلفی می توانند باعث ایجاد ناباروری شوند که ناشی از ۳ منبع عمومی یعنی اختلالات فیزیولوژیکی، عوامل قابل پیشگیری و عوامل ناشناخته می باشد. مشکلات آناتومیک، ژنتیکی، غدد و ایمنی نیز از علل ناباروری هستند. علل فیزیولوژیکی در مردان شامل مسائل مربوط به تعداد اسپرم، تحرک اسپرم، کیفیت و اختلالات در خروج اسپرم است. عوامل قابل پیشگیری دیگر شامل شیوه زندگی مثل چاقی، افزایش و از دست دادن وزن، سوء تغذیه و ورزش بیش از حد و استفاده از نیکوتین الکل و کافئین می باشد. خطرات زیست محیطی و شغلی، دیگر علل ناباروری هستند (۱۴). ژن های متعددی نظیر CFTR و XFP-2-3 NSL برای تکوین طبیعی گناد و اسپرماتوژنز ضروری هستند. یکی از مهمترین ژن های دخیل در فرایندهای تولید مثلی ژن Fas است. Fas یک پروتئین تراغشایی عضو ابر خانواده فاکتور نکروز توموری است. Fas نقش مهمی در القای آپاپتوز در سلول های مختلف دارد. FasL هم عضوی از ابر خانواده فاکتور نکروز توموری است و شروع کننده آبشار پیام مرگ است که در نتیجه آپاپتوز در سلول رخ می دهد (۱۵). چندین پلی مورفیسم در ژن Fas شناسایی شده است. ژن های Fas و FasL به ترتیب روی ۱۰q۲۴.۱ و ۱۶q۲۳ قرار دارند (۱۶) و (۱۷).

در رابطه با نقش پلی مورفیسم ژن Fas بر ناباروری مردان مطالعات زیادی در جمعیت های مختلف صورت گرفته است. به عنوان مثال در تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ در جمعیت های چین انجام شد، ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و ناباروری مردان مشاهده نشد (۱۸). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۴ در جمعیت جنوب شرقی ترکیه صورت گرفت پلی مورفیسم ۶۷۰-Fas به عنوان یک عامل مستعد کننده ژنتیکی آرواسپرمی ایدیوپاتیک در این جمعیت در نظر گرفته

شد (۱۹). همچنین در سال ۲۰۱۲ و ۲۰۰۹ پلی مورفیسم ۶۷۰-Fas به عنوان عامل غیر عملکردی کننده آپاپتوز سلول جنسی و در نهایت ناباروری در نظر گرفته شد (۲۰). با توجه به تحقیق انجام شده در جمعیت استان گیلان و تعداد نمونه های مورد مطالعه، بین پلی مورفیسم ژن Fas و ناباروری مردان ارتباط معنی داری وجود ندارد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که احتمالاً ژنوتیپ ۶۷۰-Fas - GG نقش موثری در افزایش احتمال ناباروری در مردان مورد مطالعه ایفا نمی کند. در نتیجه نمی توان ژنوتیپ GG را به عنوان یک فاکتور خطر برای عدم موفقیت باروری در مردان جمعیت گیلان مطرح نمود. چون خزانه ژنی جمعیت های مختلف با هم متفاوت است و در مطالعات مختلف از تعداد نمونه ها و روش های بررسی متفاوتی بهره می برند. لازم به ذکر است که نتایج بدست آمده ممکن است توسط عوامل مختلف مانند نقص دستگاه های مورد استفاده، آلودگی محیط آزمایشگاه تحت تاثیر قرار گیرد اما در این تحقیق از جمعیت مناسبی از نمونه های نابارور مردان استفاده شده است که بالا بودن تعداد نمونه ها می تواند میزان خطا را تا حدی کاهش دهد.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می دهد که نتایج حاصل از بررسی پلی - مورفیسم در جمعیت های مختلف متفاوت خواهد بود. با توجه به تحقیق انجام شده در جمعیت استان گیلان و تعداد نمونه های مورد مطالعه، بین پلی مورفیسم ژن Fas و ناباروری مردان ارتباط معنی داری وجود ندارد. به این ترتیب در خصوص ارتباط پلی مورفیسم ژن Fas و ناباروری مردان در جمعیت های مختلف به منظور تأیید وجود یا فقدان هر گونه ارتباط به مطالعات وسیع تری نیاز است.

قدر دانی

از کلیه کسانی که در انجام این پروژه مشارکت و همکاری داشتند م و مسئولین محترم آزمایشگاه تکوین دانشکده علوم دانشگاه گیلان تقدیر و تشکر به عمل می آید. مقاله برگرفته از پایان نامه باشد، شماره پایان نامه ۶۲۹۹ می باشد. مشارکت مؤلفان: رع کارهای آزمایشگاهی را انجام داده، ف م راهنمایی و طراحی پروژه و تحلیل نتایج و همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است. م ه ب در تامین نمونه ها مشارکت داشتند. ملاحظات اخلاقی: پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه گیلان به شماره مرجع ۱-۴-۱۳۹۲ به تایید رسیده است.

References

1. Cram DS, O'Bryan MK, de Kretser DM. Male infertility genetics the future. *J Androl* 2001; **22**: 738-746.
2. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. *Fertil Steril* 1983; **39**: 5-21. doi: 10.1016/S0015-0282(16)46750-6
3. Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 1999; **140**: 852-858. doi: 10.1210/endo.140.2.6479
4. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; **4**: 746-754.
5. Jung JY, Kim WJ. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl₂-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 2004; **371**: 85-90. doi: 10.1016/j.neulet.2004.06.069
6. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Moretti L, Monterastelli E, Mazzacani A. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 431-438. doi: 10.1038/sj/cdd/4400964
7. Ji G, Gu A, Hu F, Wang S, Liang J, Xia Y. Polymorphisms in cell death pathway genes are associated with altered sperm apoptosis and poor semen quality. *Hum Reprod* 2009; **24**: 2439-2446. doi: 10.1093/humrep/dep223
8. López-Hernández FJ, Ortiz MA, Piedrafita FJ. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are differentially affected by temperature upstream of mitochondrial damage. *Apoptosis* 2006; **11**: 1339-1347.
9. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 1996; **384**: 638-641. doi: 10.1038/384638a0
10. Sneller MC, Wang J, Dale JK. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 1997; **89**: 1341-1348.
11. Genc MR, Schantz-Dunn J. The role of gene-environment interaction in predicting adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; **21**: 491-504. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2007.01.009
12. Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. *Am J Clin Pathol* 2002; **117** Suppl 2: S95-103. doi: 10.1309/W8LJ-K377-DHRA-CP0B
13. Vayena E, Rowe P, Peterson H. Assisted reproductive technology in developing countries: why should we care? *Fertil Steril* 2002; **78**: 13-15. doi: 10.1016/S0015-0282(02)03177-1
14. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin D, editors. Report of a meeting on "Medical, Ethical, and Social Aspects of Assisted Reproduction; Geneva, Switzerland, WHO; 2002; **1**: 16-21.
15. Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Advances in Immunology* 1994; **57**: 129-144. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60672-0
16. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994; **6**: 1567-1574. doi: 10.1093/intimm/6.10.1567
17. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *European Journal of Immunology* 1994; **24**: 3057-3062. doi: 10.1002/eji.1830241221
18. Xu M, Qin Y, Qu J, Lu C, Wang Y, Wu W. Evaluation of five candidate genes from GWAS for association with oligozoospermia in a Han Chinese population. *PLoS One* 2013; **8**: e80374. doi: 10.1371/journal.pone.0080374
19. Balkan M, Atar M, Erdal ME, Rustemoğlu A, Yildiz I, Gunesacar R. Possible Association of FAS and FASLG Polymorphisms with the Risk of Idiopathic Azoospermia in Southeast Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014; **18**: 383-388. doi: 10.1089/gtmb.2013.0454
20. Zhu J, Qin C, Wang M, Yan F, Ju X, Meng X. Functional polymorphisms in cell death pathway genes and risk of renal cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2010; **49**: 810-817. doi: 10.1002/mc.20656