

TRUCHTA, Monika, AUGUSTYNOWICZ, Kinga, MARCINKOWSKA, Marta, STOLIŃSKI, Michał & ŚWIADER, Kinga. Folic acid - influence on male fertility, spermatogenesis, sperm DNA fragmentation and subsequent growth of the embryo and fetus. *Journal of Education, Health and Sport*. 2023;34(1):51-60. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2023.34.01.004>
<https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/43762>
<https://zenodo.org/record/7979693>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu). © The Authors 2023; This article is published with open access at License Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited. The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. Received: 27.04.2023. Revised: 10.05.2023. Accepted: 28.05.2023. Published: 28.05.2023.

Folic acid- influence on male fertility, spermatogenesis, sperm DNA fragmentation and subsequent growth of the embryo and fetus

Kwas foliowy- wpływ na męską płodność, spermatogenezę, fragmentację DNA plemników i późniejszy rozwój zarodka i płodu

Monika Truchta

Centralny Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi ul. Pomorska 251, 92-213
Łódź

ORCID 0009-0000-8177-9164

<https://orcid.org/0009-0000-8177-9164>

E-mail: monikatruchta@gmail.com

Kinga Augustynowicz

Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralny Szpital
Weteranów Stefana Żeromskiego 113, 90-549 Łódź

ORCID 0000-0003-4547-9599

<https://orcid.org/0000-0003-4547-9599>

E-mail: kingaugustynowicz@gmail.com

Marta Marcinkowska

Powiatowego Centrum Zdrowia w Brzezinach sp. z o.o. Marii Curie–Sklodowskiej 6, 95-060
Brzeziny

ORCID 0009-0000-5318-1886

<https://orcid.org/0009-0000-5318-1886>

E-mail marta.marcinkowska96@gmail.com

Michał Stoliński

SP ZOZ Szpital Powiatowy im. Edmunda Biernackiego w Opocznie ul. Partyzantów 30, 26 –
300 Opoczno

ORCID 0009-0005-5865-3789

<https://orcid.org/0009-0005-5865-3789>

E-mail michalstolinski1995@gmail.com

Kinga Świąder

Faculty of Medicine, Uniwersytet Medyczny w Łodzi Plac Gen. Józefa Hallera 1, 90-647
Łódź

ORCID 0000-0003-0185-6524

<https://orcid.org/0000-0003-0185-6524>

E-mail: kingaswiader@icloud.com

Abstract

Introduction: Men's infertility is a multifactorial disorder. According to scientific literature, among men with reduced fertility, growing interest in folic acid is observed.

This review describes the effect of folic acid on spermatogenesis, sperm concentration, sperm DNA fragmentation and the growth of the embryo and fetus.

Material and methods: The work was based on the articles published in PubMed, medical books and websites.

Results: Folic acid affects the trajectory of embryo growth in pregnancy conceived spontaneously, there is a negative correlation between the concentration of folic acid in the semen and the indicator of sperm DNA fragmentation and sperm concentration are statistically higher in folic acid supplements.

Conclusions: The results suggest that the father's exposure to folic acid before conception may affect the health of his offspring, and therefore care before conception should be changed from an approach focused on a woman to a couple-based approach.

Keywords: „Folic acid”, „spermatogenesis”, „male infertility”.

Wprowadzenie

W opiece przed zajściem w ciążę stosowanie kwasu foliowego (B9) u matki jest dobrze znane ze względu na jego rolę w zapobieganiu wrodzonym wadom rozwojowym, w szczególności wadom cewy nerwowej i wrodzonym wadom serca. Ze względu na udowodnioną ochronną rolę B9 w reprodukcji człowieka, Światowa Organizacja Zdrowia zaleca wszystkim kobietom stosowanie 0,4 mg kwasu foliowego od momentu planowania ciąży do 12 tygodnia ciąży. Zarodek i płód rozwijają się w środowisku matki, dlatego nie jest zaskakujące, że wcześniejsze badania były skupione głównie na statusie kwasu foliowego u matki w kwestii do okresu okołokoncepcyjnego i przebiegu ciąży.

Niemniej jednak niemożność posiadania dzieci dotyka od 10% do 15% par na całym świecie [4]. Szacuje się, że czynnik męski odpowiada za nawet połowę przypadków niepłodności [5]. Bezdzielnosć może być bardzo trudnym doświadczeniem dla par. Wiele zaburzeń andrologicznych niestety nadal pozostaje niewyjaśnionych. Przy czym uważa się, że od 25% do 87% męskiej niepłodności jest spowodowane efektem stresu oksydacyjnego, kolejnym natomiast idiopatyczna niepłodność męska, która jest zasadniczo związana ze zmianami w stylu życia, narażenia środowiskowego oraz nawyków żywieniowych [4], [23], [24]. W związku z tym według literatury naukowej wśród mężczyzn z obniżoną płodnością obserwuje się rosnące zainteresowanie kwasem foliowym, który jest jednym z przeciwutleniaczy [4].

Co to jest kwas foliowy

Foliany to grupa rozpuszczalnych w wodzie witamin. Głównymi naturalnymi źródłami kwasu foliowego są owoce np., pomarańcze, warzywa np. sałata, szpinak, brokuły, kapusta, kalafior, brukselka, szparagi, bób, zielony groszek, buraki, pomidory i orzechy np. arachidowe czy laskowe [9].

Foliany działają jak substraty i kofaktory reakcji biologicznych w tym w syntezie DNA i RNA, replikacji komórek, sygnalizacji komórkowej i regulacji ekspresji genów poprzez metylację [1], [25], [26]. Mimo rozpuszczalności w wodzie kwas foliowy hamuje peroksydację lipidów. Dlatego kwas foliowy może chronić bioskładniki, takie jak błony komórkowe lub DNA, przed uszkodzeniem przez wolne rodniki [4].

Mechanizm działania kwasu foliowego

Kwas foliowy jako substrat bierze udział w syntezie lipidów, białek, DNA i RNA, neutralizowaniu reaktywnych rodników oksydacyjnych, naprawie DNA i epigenetyce. Mechanizmy te uczestniczą w namnażaniu i różnicowaniu komórek, apoptozie, sygnalizacji i

programowaniu, a więc w spermatogenezie i embriogenezie. Kwas foliowy to początkowy substrat w metabolizmie jednowęglowym [7], [27]. Kluczową funkcją cyklu jednowęglowego jest wychwytywanie reaktywnych form tlenu przez przeciwutleniacz Glutathion, który jest syntetyzowany z kwasu foliowego razem z Homocysteiną [17]. Podwyższone poziomy reaktywnych form tlenu, spowodowane różnymi chorobami przewlekłymi, zmianami genetycznymi, zażywaniem leków, otyłością, starzeniem się oraz niezdrową dietą i stylem życia, będą prowadzić do stresu oksydacyjnego, który zmienia w ten sposób integralność DNA i późniejsze procesy molekularne zaangażowane w spermatogenezę i embriogenezę [9], [29].

Spermatogeneza

Spermatogeneza jest złożonym i niezwykle produktywnym procesem, obejmującym mitozę, mejozę i spermiogenezę odpowiednio spermatogonii, spermatocytów i plemników [28]. Wszystkie te procesy spermatogenezy mają miejsce w zamkniętej puli mikrośrodowiska w rozwoju komórek zarodkowych, które są rozmieszczone w kanalikach nasiennych jądra. Ponadto spermatogeneza oddziałuje na mechanizmy patogenezy procesu komórkowego, w tym na programowanie różnych stadiów rozwojowych komórek rozrodczych [29]. Równoległe i na początku, przez podział mejotyczny, różnicuje się do komórek spermatocytów, w dalszej kolejności w drodze mejozy, komórki te przekształcają się w plemniki [28]. Cały proces spermatogenezy opiera się na funkcjonalnych wzajemnych interakcji między komórkami rozrodczymi i somatycznymi komórkami podporowymi - komórkami Sertoliego, obejmującymi złożoną klasyfikację hormonów, cytokin i witamin. Komórki Sertoliego odgrywają zasadniczą rolę w regulowaniu i kontrolowaniu spermatogenezy poprzez kontakty fizjologiczne i strukturalne, wsparcie immunologiczne i żywieniowe, w szczególności mogą być przekształcane w komórki Leydiga, a także zmieniane w nerwowe komórki macierzyste typu morfologicznego, fenotypowego i funkcjonalnego [30].

Patofizjologia

Niedobór kwasu foliowego u ojca wpływa na epigenom plemników drogą zmiany poziomu metylacji DNA w spermatogenezie co skutkuje spotęgowaniem uszkodzeń DNA w spermatocytach [3], [14]. W stosunku do możliwości zajścia w ciążę i jej wyników należy mieć świadomość, że połowa materiału genetycznego embrionu pochodzi od mężczyzny, więc miano kwasu foliowego u ojca jest również krytycznie zaangażowany w procesy

biologiczne, takie jak synteza DNA i epigenetyczne programowanie komórek nasiennych i kolejny genom embrionalny [2]. Warto dodać, że niepłodność męska jest zaburzeniem wieloczynnikowym [6], w tym genetyką, środowiskiem lub ich interakcją [5], [20], [22].

Wyniki

Ogólne wyniki wybranych artykułów pokazują, że status kwasu foliowego u ojca jest często pozytywnie skorelowany z parametrami nasienia, ponieważ kwas foliowy i cynk mogą wpływać na parametry endokrynologiczne, np. poprzez stymulację funkcji komórek Sertoliego. One z kolei są głównymi producentami inhibiny B w organizmie człowieka. Stężenie inhibiny B w surowicy jest dodatnio związane z koncentracją plemników, objętością jąder oraz stanem nabłonka spermatogenetycznego [4]. Dodatkowo niedobór folianów znacznie zmniejsza ekspresję ESR1, CAV1 i ELAVL1, które są krytyczne dla spermatogenezy [7]. Zebrane dane ukazują również, że niski i wysoki poziom kwasu foliowego w erytrocytach u ojca jest powiązany ze zmniejszoną trajektorią wzrostu zarodka w ciążach poczętych spontanicznie [10]. Badania wykazują, że stężenie plemników i procent plemników ruchliwych są związane z płodnością i wskaźnikami trwających ciąż.

Ponadto za jakość nasienia i późniejszy obraz ciąży, takimi jak rozwój płodu, łożyska czy wrodzone wady rozwojowe odpowiada ojcowska wartość kwasu foliowego [10]. Ojcowie dzieci urodzonych z wadami cewy nerwowej mieli istotnie niższe stężenia folianów w porównaniu z ojcami dzieci urodzonych z innymi wadami wrodzonymi lub bez wad wrodzonych wad rozwojowych. Iloraz szans na wady cewy nerwowej 5,2 (95% CI: 1,3–20,8) potomstwa ojców z niskim stężeniem kwasu foliowego [9].

Kolejne badania donoszą, iż jest istotna ujemna korelacja między stężeniem kwasu foliowego w nasieniu a wskaźnikiem fragmentacji DNA plemników (DFI; $r=-0,495$, $p<0,01$) [5], [12]. Opinia jest potwierdzona przez badanie RCT wykazujące zmniejszenie uszkodzeń DNA plemników po 3 miesiącach stosowania kwasu foliowego w dawce 5 mg dziennie [15], [21]. Autorzy wykazali znaczny wzrost procentowej ruchliwości plemników (11,40–20,40%) po 3 miesiącach zażywania folianów w dawce 5 mg dziennie [9], [18]. W dodatkowej metaanalizie zauważono trend wskazujący, że 3–6 miesięcy codziennego leczenia kwasu foliowego w dawce 5 mg dziennie poprawia objętość plemników i odsetek ich ruchliwości [9], [11], [16]. Niestety trzeba być ostrożnym, ponieważ podobnie jak u kobiet, u mężczyzn nie tylko niskie, ale i zbyt wysokie stężenie folianów wiąże się z negatywnymi skutkami, takimi jak gorsza jakość nasienia i zwiększone ryzyko wad wrodzonych [8], [19]. Natomiast niski

poziom ojcowskiego kwasu foliowego wiąże się z gorszymi wynikami, podczas gdy niedobory można łatwo uzupełnić suplementacją folianów i wzbogaconą w nie dietą [13]. W związku z tym optymalizacja statusu kwasu foliowego u ojców może w przyszłości korzystnie wpływać na płodność mężczyzn i szanse na zajście w ciążę danej pary. Konieczne są również dalsze badania nad perikonceptyjnym wpływem kwasu foliowego po ojcu na wyniki epigenomu nasienia, abyśmy mogli optymalnie doradzać przyszłym rodzicom w okresie okołopoczęciowym [9].

Wnioski

Wyniki sugerują, że ekspozycja ojca na kwas foliowy przed poczęciem może mieć wpływ na zdrowie jego potomstwa, a zatem opieka przed poczęciem powinna zostać zmieniona z podejścia skoncentrowanego na kobiecie na podejściu opartym na parach [1].

Dane pokazują, że niski i wysoki poziom kwasu foliowego w erytrocytach u ojca jest związany ze zmniejszoną trajektorią wzrostu zarodka w ciążach poczętych spontanicznie. Dane te podkreślają znaczenie poziomu kwasu foliowego u ojca w okresie okołopoczęciowym [2].

Stężenie plemników było statystycznie wyższe u mężczyzn suplementowanych folianem niż placebo [4].

Istnieje istotna ujemna korelacja między stężeniem kwasu foliowego w nasieniu a wskaźnikiem fragmentacji DNA plemników [5].

Niepłodność męska jest zaburzeniem wieloczynnikowym, a także czynniki żywieniowe odgrywają ważną rolę w wynikach podawania suplementacji parametrów nasienia [6].

Bibliografia

[1] Martín-Calvo N, Mínguez-Alarcón L, Gaskins AJ, Nassan FL, Williams PL, Souter I, Hauser R, Chavarro JE; EARTH Study team. Paternal preconception folate intake in relation to gestational age at delivery and birthweight of newborns conceived through assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2019 Nov;39(5):835-843. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.07.005. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31564651; PMCID: PMC6848767.

- [2] Hoek J, Koster MPH, Schoenmakers S, Willemsen SP, Koning AHJ, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM. Does the father matter? The association between the periconceptional paternal folate status and embryonic growth. *Fertil Steril*. 2019 Feb;111(2):270-279. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.017. PMID: 30691629.
- [3] Cheng PJ, Pastuszak AW, Hotaling JM. Is it time to start folate supplementation in men? The effect of paternal folate status on embryonic growth. *Fertil Steril*. 2019 Feb;111(2):251-252. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.11.017. Epub 2018 Dec 28. PMID: 30598167.
- [4] Irani M, Amirian M, Sadeghi R, Lez JL, Latifnejad Roudsari R. The Effect of Folate and Folate Plus Zinc Supplementation on Endocrine Parameters and Sperm Characteristics in Sub-Fertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Urol J*. 2017 Aug 29;14(5):4069-4078. PMID: 28853101.
- [5] Wang W, Peng M, Yuan H, Liu C, Zhang Y, Fang Y, Su Y, Zhang X, Zhang H, Tang Y, Zhao K. Studying the mechanism of sperm DNA damage caused by folate deficiency. *J Cell Mol Med*. 2022 Feb;26(3):776-788. doi: 10.1111/jcmm.17119. Epub 2021 Dec 24. PMID: 34953021; PMCID: PMC8817123.
- [6] Raigani M, Yaghmaei B, Amirjannti N, Lakpour N, Akhondi MM, Zeraati H, Hajihosseinal M, Sadeghi MR. The micronutrient supplements, zinc sulphate and folic acid, did not ameliorate sperm functional parameters in oligoasthenoteratozoospermic men. *Andrologia*. 2014;46(9):956-62. doi: 10.1111/and.12180. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24147895.
- [7] Yuan HF, Zhao K, Zang Y, Liu CY, Hu ZY, Wei JJ, Zhou T, Li Y, Zhang HP. Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of *Esr1*, *Cav1*, and *Elavl1*, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):24130-24141. doi: 10.18632/oncotarget.15731. PMID: 28445960; PMCID: PMC5421833.
- [8] Chan D, McGraw S, Klein K, Wallock LM, Konermann C, Plass C, Chan P, Robaire B, Jacob RA, Greenwood CM, Trasler JM. Stability of the human sperm DNA methylome to folic acid fortification and short-term supplementation. *Hum Reprod*. 2017 Feb;32(2):272-283. doi: 10.1093/humrep/dew308. Epub 2016 Dec 18. PMID: 27994001; PMCID: PMC5260859.
- [9] Hoek J, Steegers-Theunissen RPM, Willemsen SP, Schoenmakers S. Paternal Folate Status and Sperm Quality, Pregnancy Outcomes, and Epigenetics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Nutr Food Res*. 2020 May;64(9):e1900696. doi: 10.1002/mnfr.201900696. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32032459; PMCID: PMC7317557.
- [10] Schisterman EF, Clemons T, Peterson CM, Johnstone E, Hammoud AO, Lamb D, Carrell DT, Perkins NJ, Sjaarda LA, Van Voorhis BJ, Ryan G, Summers K, Campbell B,

- Robins J, Chaney K, Mills JL, Mendola P, Chen Z, DeVilbiss EA, Mumford SL. A Randomized Trial to Evaluate the Effects of Folic Acid and Zinc Supplementation on Male Fertility and Livebirth: Design and Baseline Characteristics. *Am J Epidemiol*. 2020 Jan 31;189(1):8-26. doi: 10.1093/aje/kwz217. PMID: 31712803; PMCID: PMC8204144.
- [11] Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJ, Lindemans J, Laven JS, Macklon NS, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 2009 Aug;92(2):548-56. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.06.010. Epub 2008 Aug 22. PMID: 18722602.
- [12] Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 2002 Mar;77(3):491-8. doi: 10.1016/s0015-0282(01)03229-0. PMID: 11872201.
- [13] Cueto HT, Jacobsen BH, Laursen ASD, Riis AH, Hatch EE, Wise LA, Trolle E, Sørensen HT, Rothman KJ, Wesselink AK, Willis S, Johannesen BR, Mikkelsen EM. Dietary folate intake and fecundability in two preconception cohorts. *Hum Reprod*. 2022 Apr 1;37(4):828-837. doi: 10.1093/humrep/deac002. PMID: 35051293; PMCID: PMC8971647.
- [14] Ly L, Chan D, Aarabi M, Landry M, Behan NA, MacFarlane AJ, Trasler J. Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *Mol Hum Reprod*. 2017 Jul 1;23(7):461-477. doi: 10.1093/molehr/gax029. PMID: 28535307; PMCID: PMC5909862.
- [15] Mathieu d'Argent E, Ravel C, Rousseau A, Morcel K, Massin N, Sussfeld J, Simon T, Antoine JM, Mandelbaume J, Daraï E, Kolanska K. High-Dose Supplementation of Folic Acid in Infertile Men Improves IVF-ICSI Outcomes: A Randomized Controlled Trial (FOLFIV Trial). *J Clin Med*. 2021 Apr 26;10(9):1876. doi: 10.3390/jcm10091876. PMID: 33925981; PMCID: PMC8123699.
- [16] Xie C, Ping P, Ma Y, Wu Z, Chen X. Correlation between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and oligoasthenospermia and the effects of folic acid supplementation on semen quality. *Transl Androl Urol*. 2019 Dec;8(6):678-685. doi: 10.21037/tau.2019.11.17. PMID: 32038964; PMCID: PMC6987591.
- [17] Najafipour R, Moghbelinejad S, Aleyasin A, Jalilvand A. Effect of B9 and B12 vitamin intake on semen parameters and fertility of men with MTHFR polymorphisms. *Andrology*. 2017 Jul;5(4):704-710. doi: 10.1111/andr.12351. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28440964.

- [18] Huang WJ, Lu XL, Li JT, Zhang JM. Effects of folic acid on oligozoospermia with MTHFR polymorphisms in term of seminal parameters, DNA fragmentation, and live birth rate: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Andrology*. 2020 Jan;8(1):110-116. doi: 10.1111/andr.12652. Epub 2019 May 24. PMID: 31127676.
- [19] Chan D, Shao X, Dumargne MC, Aarabi M, Simon MM, Kwan T, Bailey JL, Robaire B, Kimmins S, San Gabriel MC, Zini A, Librach C, Moskovtsev S, Grundberg E, Bourque G, Pastinen T, Trasler JM. Customized MethylC-Capture Sequencing to Evaluate Variation in the Human Sperm DNA Methylome Representative of Altered Folate Metabolism. *Environ Health Perspect*. 2019 Aug;127(8):87002. doi: 10.1289/EHP4812. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31393794; PMCID: PMC6792365.
- [20] González-Rodríguez LG, López-Sobaler AM, Perea Sánchez JM, Ortega RM. Nutrición y fertilidad [Nutrition and fertility]. *Nutr Hosp*. 2018 Sep 7;35(Spec No6):7-10. Spanish. doi: 10.20960/nh.2279. PMID: 30351153.
- [21] Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 May 19;16(1):49. doi: 10.1186/s12958-018-0369-3. PMID: 29778100; PMCID: PMC5960110.
- [22] Mumford SL, Johnstone E, Kim K, Ahmad M, Salmon S, Summers K, Chaney K, Ryan G, Hotaling JM, Purdue-Smithe AC, Chen Z, Clemons T. A Prospective Cohort Study to Evaluate the Impact of Diet, Exercise, and Lifestyle on Fertility: Design and Baseline Characteristics. *Am J Epidemiol*. 2020 Nov 2;189(11):1254-1265. doi: 10.1093/aje/kwaa073. PMID: 32472141; PMCID: PMC7604525.
- [23] Liu KS, Mao XD, Pan F, An RF. Effect and mechanisms of reproductive tract infection on oxidative stress parameters, sperm DNA fragmentation, and semen quality in infertile males. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021 Jun 28;19(1):97. doi: 10.1186/s12958-021-00781-6. PMID: 34183027; PMCID: PMC8237428.
- [24] Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed*. 2016 Dec;14(12):729-736. PMID: 28066832; PMCID: PMC5203687.
- [25] Mahajan A, Sapehia D, Thakur S, Mohanraj PS, Bagga R, Kaur J. Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Sci Rep*. 2019 Nov 26;9(1):17602. doi: 10.1038/s41598-019-54070-9. PMID: 31772242; PMCID: PMC6879517.

- [26] Aarabi M, Christensen KE, Chan D, Leclerc D, Landry M, Ly L, Rozen R, Trasler J. Testicular MTHFR deficiency may explain sperm DNA hypomethylation associated with high dose folic acid supplementation. *Hum Mol Genet.* 2018 Apr 1;27(7):1123-1135. doi: 10.1093/hmg/ddy021. PMID: 29360980; PMCID: PMC6159534.
- [27] Perrier F, Viallon V, Ambatipudi S, Ghantous A, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Chajès V, Baglietto L, Matejčić M, Moreno-Macias H, Kühn T, Boeing H, Karakatsani A, Kotanidou A, Trichopoulou A, Sieri S, Panico S, Fasanelli F, Dolle M, Onland-Moret C, Sluijs I, Weiderpass E, Quirós JR, Agudo A, Huerta JM, Ardanaz E, Dorronsoro M, Tong TYN, Tsilidis K, Riboli E, Gunter MJ, Herceg Z, Ferrari P, Romieu I. Association of leukocyte DNA methylation changes with dietary folate and alcohol intake in the EPIC study. *Clin Epigenetics.* 2019 Apr 2;11(1):57. doi: 10.1186/s13148-019-0637-x. PMID: 30940212; PMCID: PMC6444439.
- [28] Szukiewicz D., Układ Płciowy. W: red. nauk. Maśliński S., Ryzewski J., Patofizjologia. T.2. Warszawa 2022.
- [29] Shi F, Zhang Z, Cui H, Wang J, Wang Y, Tang Y, Yang W, Zou P, Ling X, Han F, Liu J, Chen Q, Liu C, Cao J, Ao L. Analysis by transcriptomics and metabolomics for the proliferation inhibition and dysfunction through redox imbalance-mediated DNA damage response and ferroptosis in male reproduction of mice and TM4 Sertoli cells exposed to PM_{2.5}. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Jun 15;238:113569. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113569. Epub 2022 May 2. PMID: 35512470.
- [30] Ziaiepour S, Ahrabi B, Naserzadeh P, Aliaghaei A, Sajadi E, Abbaszadeh HA, Amini A, Abdi S, Darabi S, Abdollahifar MA. Effects of Sertoli Cell Transplantation on Spermatogenesis in Azoospermic Mice. *Cell Physiol Biochem.* 2019;52(3):421-434. doi: 10.33594/000000030. Epub 2019 Mar 8. PMID: 30845381.