Wprowadzenie: Niepłodność dotyczy około 17,5% dorosłych, z czego czynnik męski jest odpowiedzialny za blisko 50% jej przypadków. Rutynowa analiza nasienia jest niewystarczająca do wyjaśnienia mechanizmów obniżonej płodności, szczególnie idiopatycznej, co uzasadnia poszukiwanie nowych biomarkerów, mogących zarówno usprawnić diagnostykę, jak i pogłębić zrozumienie molekularnych podstaw niepłodności męskiej. Do obiecujących kandydatów należą wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFAs), ich metabolity oraz enzymy antyoksydacyjne obecne w plazmie nasienia, jednak ich rola biologiczna i potencjał kliniczny pozostają nie w pełni poznane i wymagają dalszych badań z wykorzystaniem szybszych procedur i bardziej wydajnych metod analitycznych.

Cel badań: Główne cele przeprowadzonych badań obejmowały: 1) optymalizację metody ekstrakcji PUFAs z plazmy nasienia w celu przeprowadzenia analizy ich stężeń z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC–MS/MS; 2) weryfikację użyteczności oznaczeń stężeń obecnych w plazmie nasienia wybranych PUFAs (kwasu linolowego (LA), α-linolenowego (ALA), γ-linolenowego (GLA), arachidonowego (AA), eikozapentaenowego (EPA), dokozaheksaenowego (DHA)), pochodnych AA (prostaglandyny E_2 (PGE_2), 6-keto-prostaglandyny $F_{1\alpha}$ (6-keto-$PGF_{1\alpha}$), F_2-izoprostanu) oraz enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD_1), peroksydazy glutationowej 1 (GPX_1), syntazy tlenku azotu 1 (NOS_1)) w diagnostyce niepłodności męskiej, z uwzględnieniem jej poszczególnych rodzajów; 3) analizę korelacji między wartościami stężeń badanych parametrów oraz odniesienie ich do parametrów standardowej analizy nasienia w celu pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do obniżenia jakości nasienia; 4) analizę wpływu uaktualnienia w 2021 roku przez WHO kryteriów diagnostycznych niepłodności męskiej na wyciągnięte wcześniej wnioski dotyczące stężeń PUFAs w plazmie nasienia.

Materiał i metody: Materiałem badanym były łącznie 272 plazmy nasienia pochodzące od mężczyzn o udowodnionej płodności (n = 22) oraz niepłodnych (n = 250; wyodrębnione podgrupy to: teratozoospermiczna (T, n = 73), asthenozoospermiczna (A, n = 12), azoospermiczna (Azoo, n = 23), niepłodna normozoospermiczna (NI, n = 16), asthenoteratozoospermiczna (AT, n = 68), oligoteratozoospermiczna (OT, n = 16) i oligoasthenoteratozoospermiczna (OAT, n = 42)). Stężenia PUFAs oznaczono z wykorzystaniem zoptymalizowanego protokołu ekstrakcji i metody GC–MS/MS, a do oznaczeń stężeń wybranych pochodnych AA i enzymów antyoksydacyjnych zastosowano

komercyjnie dostępne immunoenzymatyczne testy fazy stałej ELISA. Analizę statystyczną danych przeprowadzono w programach Statistica 13.3 PL oraz GraphPad Prism.

Wyniki: Po raz pierwszy do oznaczeń stężeń PUFAs w plazmie nasienia zastosowano GC–MS/MS, a optymalizacja metody ich ekstrakcji pozwoliła na ograniczenie objętości materiału badanego do 75 µl i skrócenie czasu estryfikacji do 3 godzin. Spośród trzydziestu jeden badanych parametrów, dziewięć (stężenia LA, GLA, EPA, DHA oraz stosunki stężeń ALA/LA, LA/AA, EPA/ALA, EPA/GLA, EPA/AA) istotnie różniło się między grupą mężczyzn płodnych a pacjentami niepłodnymi (mediany: 0,493 vs. 0,762 µg/ml, $p = 0{,}007$; 0,029 vs. 0,035 µg/ml, $p = 0{,}005$; 0,007 vs. 0,009 µg/ml, $p < 0{,}001$; 1,519 vs. 2,174 µg/ml, $p = 0{,}029$; 0,066 vs. 0,053, $p = 0{,}042$; 0,248 vs. 0,305, $p = 0{,}002$; 0,168 vs. 0,216, $p = 0{,}010$; 0,230 vs. 0,283, $p = 0{,}013$; 0,003 vs. 0,004, $p = 0{,}045$). Stężenia LA, GLA oraz stosunki stężeń LA/AA, EPA/ALA i EPA/GLA wykazały ograniczoną (AUC < 0,650), a stężenie EPA umiarkowaną (AUC = 0,709) użyteczność diagnostyczną. Wykazano, że następujące parametry różnicowały co najmniej dwie badane grupy: stężenia LA, GLA, AA, EPA, DHA, PGE_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ oraz stosunki stężeń ALA/LA, LA/DHA, ALA/GLA, EPA/ALA, ALA/DHA, EPA/GLA, GLA/DHA, AA/DHA, EPA/DHA i PGE_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$, przy czym różnice te obserwowane były najczęściej dla grupy T. Ponadto zaobserwowano, że stężenia DHA, GPX_1 i F_2-izoprostanu, a także stosunki stężeń LA/DHA, ALA/DHA, GLA/DHA, AA/DHA oraz EPA/DHA wykazywały co najmniej jedną umiarkowaną korelację z parametrami nasienia ($0{,}4 < |R|$, $p < 0{,}05$). Podobne korelacje stwierdzono również między badanymi parametrami: PGE_2 i 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, PGE_2 i ALA, PGE_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$ i ALA oraz EPA, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ i EPA, F_2-izoprostan i SOD_1 oraz NOS_1 i SOD_1. Kluczowym, nowatorskim aspektem badań było określenie nieznanych dotąd dla ludzkiej plazmy nasienia wartości stężeń wybranych izoform enzymów. Mediany stężeń w grupie mężczyzn płodnych i niepłodnych wynosiły odpowiednio: PGE_2: 8,27 vs. 7,45 µg/ml, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 155,14 vs. 159,30 ng/ml, F_2-izoprostan: 204,03 vs. 207,62 ng/l, SOD_1: 16,40 vs. 20,31 ng/ml, GPX_1: 28,12 vs. 32,04 ng/ml oraz NOS_1: 4,28 vs. 4,15 ng/ml. Wskazano również potrzebę uzupełnienia badania ogólnego nasienia o dodatkowy parametr, tj. koncentrację plemników o nieprawidłowej morfologii. Co istotne, klasyfikacja tych samych pacjentów według wytycznych WHO dla badania ogólnego nasienia z 2010 oraz 2021 roku nie wykazała istotnych różnic ani w wartościach analizowanych parametrów, ani w ich interpretacji.

Wnioski: Zastosowanie metody GC–MS/MS w połączeniu ze zoptymalizowaną procedurą ekstrakcji pozwala na relatywnie szybką i wiarygodną analizę stężeń PUFAs przy wykorzystaniu minimalnej objętości materiału badanego, co stanowi obiecujące nowatorskie rozwiązanie. Stężenia i stosunki stężeń wybranych PUFAs wykazują potencjał różnicowania mężczyzn płodnych i niepłodnych, w przeciwieństwie do metabolitów AA oraz badanych enzymów antyoksydacyjnych. Jednocześnie wykazano, że profile PUFAs i wybranych metabolitów AA są powiązane z rodzajem zaburzeń płodności męskiej. Zaobserwowane zależności między stężeniami PUFAs a parametrami badania ogólnego nasienia wspierają hipotezę o ich pochodzeniu z uszkodzonych błon plemników, natomiast istniejące korelacje między parametrami stresu oksydacyjnego potwierdzają skoordynowaną rolę systemu antyoksydacyjnego w ochronie męskich gamet. Wykazano także, że ostatnie zmiany kryteriów diagnostycznych WHO związane z analizą seminologiczną nie wpłynęły istotnie na dotychczasową interpretację wyników. Ponadto wyznaczenie zakresów stężeń wybranych izoform enzymów antyoksydacyjnych oraz wprowadzenie nowego parametru − koncentracji plemników o nieprawidłowej morfologii − uzupełnia lukę informacyjną i stanowi nowy, ważny przyczynek do wzbogacenia wiedzy w tym zakresie. Wyniki przeprowadzonych wieloaspektowych badań potwierdzają, że plazma nasienia jest cennym źródłem biomarkerów oraz informacji o mechanizmach zaburzeń płodności męskiej, co ma szansę przełożyć się na rozwój spersonalizowanych strategii diagnostyczno-terapeutycznych.

Introduction: Infertility affects approximately 17.5% of adults, with the male factor accounting for nearly 50% of all cases. Standard semen analysis is insufficient to elucidate the mechanisms underlying reduced fertility, particularly in idiopathic cases, thereby justifying the search for novel biomarkers that could both improve diagnostic process and enhance the understanding of the molecular basis of male infertility. Promising candidates include polyunsaturated fatty acids (PUFAs), their metabolites, and antioxidant enzymes present in seminal plasma; however, their biological roles and clinical utility remain incompletely characterized and require further investigation, particularly with the use of faster procedures and more efficient analytical methods.

The aim of the study: The main objectives of the present study were as follows: 1) to optimize the extraction method of PUFAs from seminal plasma to analyze their concentrations using gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC–MS/MS); 2) to evaluate the diagnostic utility of determining the concentrations of selected PUFAs present in seminal plasma (linoleic acid (LA), α-linolenic acid (ALA), γ-linolenic acid (GLA), arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA)) as well as AA derivatives (prostaglandin E_2 (PGE_2), 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-$PGF_{1\alpha}$), and F_2-isoprostane) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase 1 (SOD_1), glutathione peroxidase 1 (GPX_1), and nitric oxide synthase 1 (NOS_1)) in the diagnosis of male infertility, with consideration of its specific subtypes; 3) to analyze correlations between the concentrations of the investigated parameters and relate them to standard semen analysis parameters in order to enhance understanding of the mechanisms underlying reduced semen quality; 4) to assess the impact of the 2021 update of the WHO diagnostic criteria for male infertility on previously drawn conclusions regarding PUFA concentrations in seminal plasma.

Material and methods: A total of 272 seminal plasma samples were analyzed, obtained from men with proven fertility (n = 22) and infertile patients (n = 250), subdivided into the following groups: teratozoospermic (T, n = 73), asthenozoospermic (A, n = 12), azoospermic (Azoo, n = 23), infertile normozoospermic (NI, n = 16), asthenoteratozoospermic (AT, n = 68), oligoteratozoospermic (OT, n = 16), and oligoasthenoteratozoospermic (OAT, n = 42). PUFA concentrations were determined using an optimized extraction protocol and GC–MS/MS, while concentrations of selected AA derivatives and antioxidant enzymes were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays ELISA. Statistical analyses were performed using Statistica 13.3 PL and GraphPad Prism software.

Results: For the first time, GC–MS/MS was applied to determine PUFA concentrations in seminal plasma, and optimization of the extraction method enabled a reduction of the sample volume to 75 µl and a shortening of the esterification time to 3 hours. Of the thirty-one analyzed parameters, nine (concentrations of LA, GLA, EPA, DHA and the ratios ALA/LA, LA/AA, EPA/ALA, EPA/GLA, EPA/AA) differed significantly between fertile men and infertile patients (medians: 0.493 vs. 0.762 µg/mL, $p = 0.007$; 0.029 vs. 0.035 µg/mL, $p = 0.005$; 0.007 vs. 0.009 µg/mL, $p < 0.001$; 1.519 vs. 2.174 µg/mL, $p = 0.029$; 0.066 vs. 0.053, $p = 0.042$; 0.248 vs. 0.305, $p = 0.002$; 0.168 vs. 0.216, $p = 0.010$; 0.230 vs. 0.283, $p = 0.013$; 0.003 vs. 0.004, $p = 0.045$). Concentrations of LA and GLA, as well as the ratios LA/AA, EPA/ALA, and EPA/GLA, demonstrated limited (AUC < 0.650), whereas EPA showed moderate diagnostic utility (AUC = 0.709). It was further demonstrated that the following parameters differentiated at least two of the analyzed groups: concentrations of LA, GLA, AA, EPA, DHA, PGE2, and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, as well as the ratios ALA/LA, LA/DHA, ALA/GLA, EPA/ALA, ALA/DHA, EPA/GLA, GLA/DHA, AA/DHA, EPA/DHA, and PGE_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$, with differences observed mostly in the T group. Moreover, concentrations of DHA, GPX_1, and F_2-isoprostane, as well as the ratios LA/DHA, ALA/DHA, GLA/DHA, AA/DHA, and EPA/DHA, showed at least one moderate correlation with semen parameters ($0.4 < |R|$, $p < 0.05$). Similar correlations were also identified between the analyzed parameters: PGE_2 and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, PGE_2 and ALA, PGE_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$ and ALA as well as EPA, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ and EPA, F_2-isoprostane and SOD_1, and NOS_1 and SOD_1. A key novel aspect of the present study was the determination, for the first time, of concentration values of selected enzyme isoforms in human seminal plasma. Median concentrations in fertile and infertile men were as follows: PGE_2: 8.27 vs. 7.45 µg/mL; 6-keto-$PGF_{1\alpha}$: 155.14 vs. 159.30 ng/mL; F_2-isoprostane: 204.03 vs. 207.62 ng/L; SOD_1: 16.40 vs. 20.31 ng/mL; GPX_1: 28.12 vs. 32.04 ng/mL; and NOS_1: 4.28 vs. 4.15 ng/mL. The need to supplement standard semen analysis with an additional parameter – the concentration of morphologically abnormal sperm – was also indicated. Importantly, classification of the same patients according to the WHO guidelines for semen analysis from 2010 and 2021 revealed no significant differences either in the values of the analyzed parameters or in their interpretation.

Conclusions: The application of GC–MS/MS in combination with an optimized extraction procedure enables relatively rapid and reliable analysis of PUFA concentrations using minimal sample volume, representing a promising and innovative approach. The concentrations and ratios of selected PUFAs demonstrate potential for distinguishing between fertile and infertile men, in contrast to AA metabolites and the analyzed antioxidant enzymes. PUFA profiles and

selected AA metabolites were shown to be associated with specific types of male infertility. The observed associations between PUFA concentrations and standard semen parameters support the hypothesis that they may originate from damaged sperm membranes, whereas the identified correlations among oxidative stress markers confirm the coordinated role of the antioxidant system in protecting male gametes. It was also demonstrated that recent changes in WHO diagnostic criteria for semen analysis did not significantly affect the interpretation of the obtained results. Furthermore, the determination of concentration ranges for selected antioxidant enzyme isoforms and introduction of a new parameter – the concentration of morphologically abnormal sperm – addresses an existing knowledge gap and provides a meaningful contribution to the field. Overall, the results of conducted comprehensive analyses confirm that seminal plasma constitutes a valuable source of biomarkers and information on the mechanisms underlying male infertility, with potential implications for the development of personalized diagnostic and therapeutic strategies.