

Umělá aktivace pohybu spermií *in vitro*

Artificial activation of sperm motility *in vitro*

P. Trávník¹⁻³, M. Jeřeta^{1,4,5}, R. Hüttelová^{1,6}, R. Křen^{1,7}, L. Landsmann^{1,8}, A. Nesvadbová^{1,9,10}, G. Tauwinklová^{1,2,11}

¹ Výbor Asociace reprodukční embryologie z.s.

² REPRODAMEDA s.r.o., Brno

³ IPVZ, Praha

⁴ Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno

⁵ FAPPZ ČZU, Praha

⁶ Cube IVF, Praha

⁷ Gennet s.r.o., Praha

⁸ Unica Prague s.r.o., Praha

⁹ IVF Clinic, Olomouc

¹⁰ Přírodovědecká fakulta, UP v Olomouci

¹¹ Ústav histologie a embryologie, LF MU, Brno

Souhrn: Cíl studie: Metoda aktivace spermií je moderní metodický přístup, který se v praxi používá stále více. Neustále přibývá nových studií zaměřených na metody umělé aktivace motility lidských spermií. Standardní metody výběru spermií mohou v některých případech selhat mimo jiné i proto, že jsou izolovány spermie velice mladé, které ještě nedokončily svůj vývoj. V těchto případech může mít umělá stimulace jejich pohybu pozitivní efekt a velice usnadnit a urychlit proces výběru vhodných spermií. Jako aktivační činidla se nejčastěji využívají methylxanthiny. Názory na bezpečnost použití těchto látek na spermie však nejsou jednotné. Cílem práce je prezentovat současné poznatky o umělé aktivaci motility spermií na *in vitro* fertilizaci a následný embryonální vývoj. **Metodika:** Rešerše relevantní literatury v databázích Web of Science, Scopus, PubMed/Medline. **Výsledky a závěr:** Z literární analýzy vyplývá, že je tato metoda bezpečná a účinná při výběru nepohyblivých spermií. Byly provedeny vědecké studie zaměřené na ověření bezpečnosti a spolehlivosti této metody. Závěrem těchto studií je pozitivní dopad tohoto způsobu výběru především u případů spermií získávaných z varletní tkáně po metodě TESE (testicular sperm extraction). V těchto případech metoda umělé aktivace spermií usnadnila a zrychlila výběr spermií před intracytoplazmatickou injekcí spermie. Aktivovány byly spermie nepoškozené, které jsou nepohyblivé z důvodu nedokončení své maturace.

Klíčová slova: spermie – *in vitro* fertilizace – motilita – teofylin

Summary: Aim: The sperm activation method is a modern methodological approach that is used more and more often in practice. The number of studies focused on methods of artificial activation of human sperm motility are constantly increasing. Standard sperm selection methods can fail in some cases, among other things, because very young sperm are isolated that have not yet completed their development. In these cases, artificial stimulation of their movement can have a positive effect and greatly facilitate and faster the process of selecting suitable sperm. Methylxanthines are most often used as activating agents. However, opinions on the safety of using these substances on sperm are not uniform. The aim of the thesis is to present current knowledge about artificial activation of sperm motility for *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development. **Methodology:** Research of relevant literature in Web of Science, Scopus, PubMed/Medline databases. **Results and conclusion:** The literature analysis shows that this method is safe and effective in the selection of immotile spermatozoa. Scientific studies have been conducted to verify the safety and reliability of this method. The conclusion of these studies is the positive impact of this method of selection, especially in cases of sperm obtained from testicular tissue after method testicular sperm extraction. In these cases, the method of artificial sperm activation facilitated and accelerated the selection of sperm before intracytoplasmic sperm injection. Undamaged spermatozoa, which are immobile due to incomplete maturation, were activated.

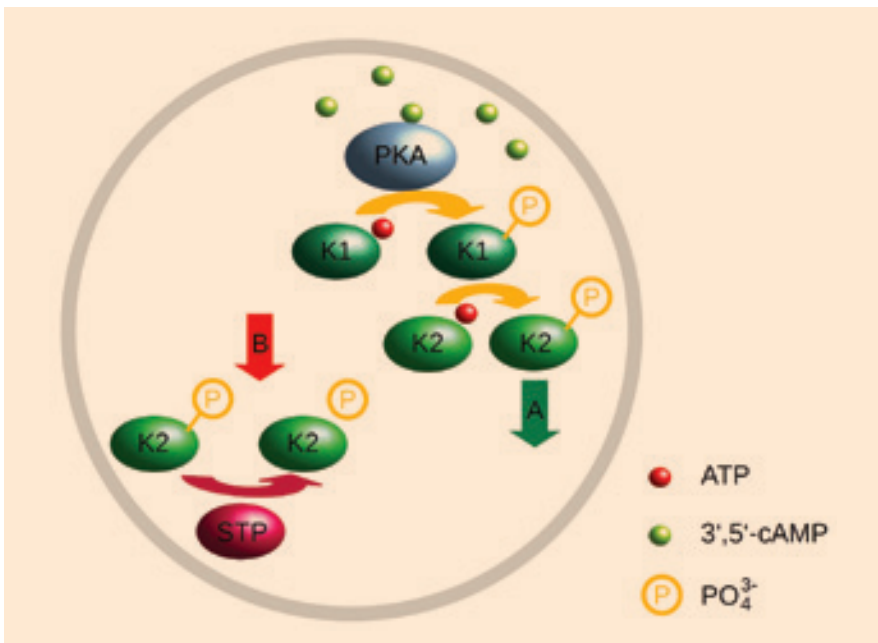
Key words: spermatozoa – *in vitro* fertilization – motility – theophylline

Úvod

Jednou z metod, která slouží ke zvýšení účinnosti oplození a podpoře dalšího vývoje embryí, je v případě handi-

capovaných spermií metoda aktivace pohybu spermií v podmínkách *in vitro* ve spojení s intracytoplazmatickou injekcí spermie (ICSI). Počátky pou-

žití aktivace pohybu spermií ve spojení s metodami asistované reprodukce se datují do začátku 90. let minulého století [1–3].



Obr. 1. Obrázek znázorňuje mechanismus aktivace pohybu spermie.

A – Proteinkináza A (PKA) je aktivována cyklickým adenosinmonofosfátem (3',5'-cAMP). Aktivní enzym spouští kaskádu fosforylace kináz (K1, K2, ...), když aktivuje další kinázy vazbou fosfátové skupiny (PO_4^{3-}) na tyrosin neaktivních enzymů za účasti adenosintrifosfátu (ATP) a tím je aktivuje.

B – Proces aktivace kináz antagonizuje odštěpením fosfátové skupiny (PO_4^{3-}) enzym serin-tyrosin fosfatáza.

Fig. 1. The figure shows mechanism of sperm motility activation.

A – Protein kinase A (PKA) is activated by cyclic adenosine monophosphate (3',5'-cAMP). The active enzyme triggers the cascade of kinase phosphorylation (K1, K2, ...) when it activates other kinases by binding a phosphate group (PO_4^{3-}) to the tyrosine of inactive enzymes with the participation of adenosine triphosphate (ATP) and thereby activates them.

B – The process of kinase activation antagonizes the serine-tyrosine phosphatase (STP) enzyme by splitting off the phosphate group (PO_4^{3-}).

Vztah mezi pohyblivostí spermie a kvalitou oplození

Spermie z jednoho ejakulátu představují značně heterogenní populaci, jen část z nich má schopnost oplodnit oocyt [4,5]. Přirozená selekce spermií je založena na průchodu spermie labyrintem ženských pohlavních cest, tedy na preferenci pohyblivých spermií [6]. Motilita je základní vlastnost spermií, která je často využívána i při jejich separaci před použitím pro *in vitro* fertilizaci (IVF). Nicméně bylo prokázáno, že nejen přirozeně pohyblivé spermie mají lepší schopnost oplodnit a zajistit kvalitní vývoj embrya, ale že selekci vhodných spermií umožní i pohyb uměle akti-

vovaný, dovolující odlišit vitální spermie schopné oplodnit vajíčko a zajistit jeho normální vývoj [7].

Pokud jsou například spermie izolovány přímo z varleční tkáně (při metodě TESE – testicular sperm extraction), jsou izolovány často nezralé spermie, které mají špatný pohyb a většina takto získaných spermií je nepohyblivých [8]. Absence pohybu v tomto případě ale není způsobena poškozením spermie, ale její nedostatečnou maturací.

Fyziologie pohybu spermie

Pohyb bičíku spermií je poháněn fosforylací axonemálních zevních dyneinových ramének spojenou s hydrolýzou adeno-

sintrifosfátu (ATP), která dodává energii potřebnou pro posouvání mikrotubulových dubletů v axonemě, jehož výsledkem je ohýbání bičíku [9,10] podmiňující dopředný rotační pohyb spermie.

Centrální úlohu v regulaci této aktivity mají zejména kalciové ionty a na cyklickém adenosinmonofosfátu (cAMP) závislá cesta proteinkinázy A (PKA) (obr. 1). Bylo prokázáno, že cAMP je primárním signálem pro nástup motility spermií [11–14].

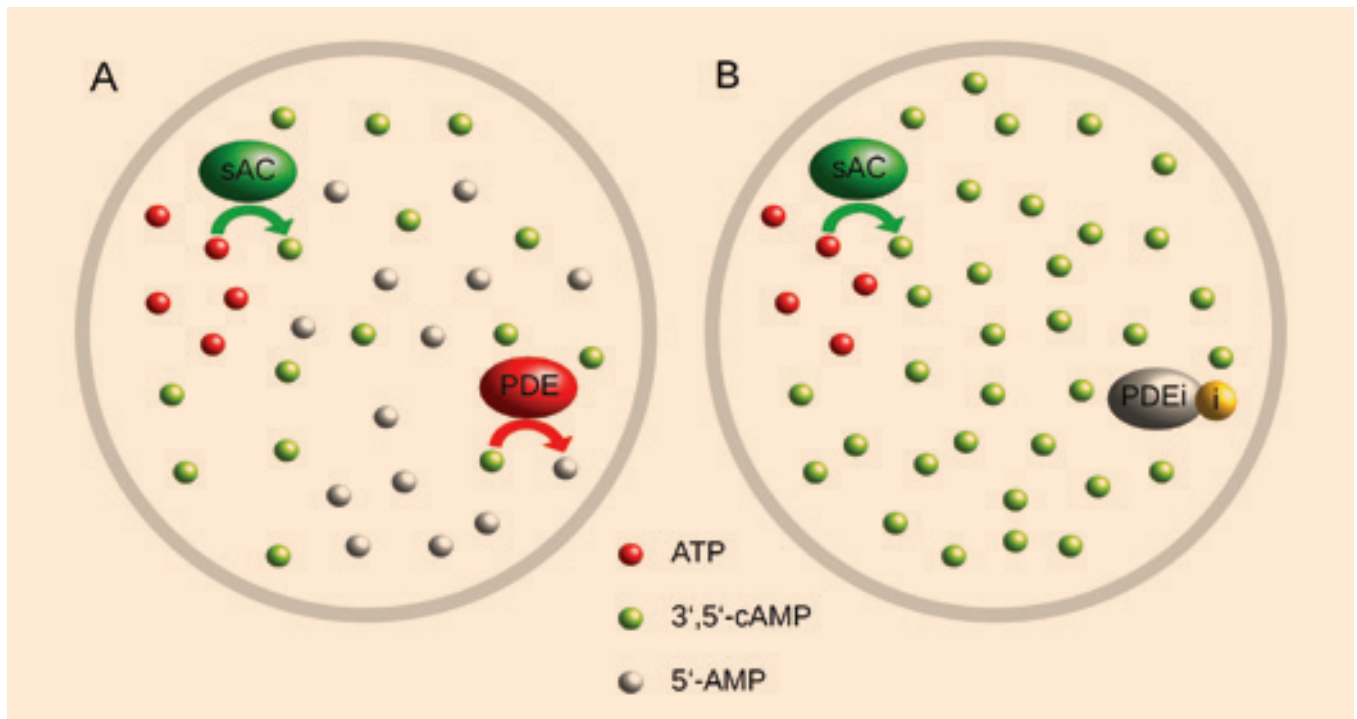
Dalšími činiteli jsou kalciový kanál Cat-Sper přítomný na membráně bičíku spermie, který je řízen napětím a pH, které je zase řízeno draslíkovými a sodíkovými kanály a ligandami ze sekretu vejcovodu [15]. Vzestup koncentrace kalcia v cytoplazmě společně se vzrůstem koncentrace hydrogencarbonátového iontu vede k aktivaci atypické solubilní adenylylcyklázy (sAC), která syntetizuje cAMP. To vede k aktivaci PKA a následné kaskády fosforylace proteinů vyvolané tyrosinkinázami a vyvažované serin/tyrosin fosfatázami, které společně regulují motilitu [16].

Antagonisty sAC syntetizující cAMP jsou fosfodiesterázy, které cAMP odbourávají za vzniku 5'-AMP. V lidských spermiích jsou přítomné jejich izoenzymy PDE1A a PDE3A [17].

Mechanismus umělé aktivace pohybu

K aktivaci pohybu lidských spermií byla vyzkoušena řada látek [3,18–20].

Nejčastěji užívanými sloučeninami pro podporu pohyblivosti spermií *in vitro* jsou inhibitory fosfodiesterázy [21]. Principem umělé aktivace pohybu spermií je zvýšení koncentrace cAMP v cytoplazmě spermií inhibicí fosfodiesteráz, které cAMP odbourávají, není tedy ovlivněna syntéza cAMP (obr. 2). Velice často se k těmto účelům používá teofylin (1,3-dimethyl-7H-purin-2,6-dion; 1,3-dimethylxanthin) patřící podobně jako kofein či teobromin do skupiny alkaloidů methylxanthinů. Methylxantiny jsou široce rozšířené látky, které se často používají jako



Obr. 2. Na obrázku je znázorněn mechanismus zvyšování koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu v bičíku spermie.

A – Schéma bičíku spermie s aktivní fosfodiesterázou. Solubilní adenylátcykláza (sAC) syntetizuje cyklický adenosinmonofosfát (3',5'-cAMP), přitom využívá adenosintrifosfát (ATP). Současně fosfodiesteráza (PDE) přeměňuje cyklický adenosinmonofosfát na neaktivní adenosinmonofosfát (5'-AMP). Tímto mechanismem je udržována stabilní koncentrace aktivního cyklického adenosinmonofosfátu.

B – Schéma bičíku spermie s inhibovanou fosfodiesterázou. Solubilní adenylátcykláza (sAC) syntetizuje cyklický adenosinmonofosfát (3',5'-cAMP). Fosfodiesteráza (PDEi) je inaktivovaná vazbou inhibitoru (i) a cyklický adenosinmonofosfát (3',5'-cAMP) neinaktivuje a ten se hromadí, což stimuluje pohyb spermie.

Fig. 2. On the figure is demonstrated the mechanism of increasing the concentration of cyclic adenosine monophosphate in the sperm flagellum.

A – Diagram of a sperm flagellum with active phosphodiesterase. Soluble adenylyl cyclase (sAC) synthesizes cyclic adenosine monophosphate (3',5'-cAMP), while utilizing adenosine triphosphate (ATP). Simultaneously, phosphodiesterase (PDE) converts cyclic adenosine monophosphate to inactive adenosine monophosphate (5'-AMP). Stable concentration of active cyclic adenosine monophosphate is maintained by this mechanism.

B – Diagram of a phosphodiesterase-inhibited sperm flagellum. Soluble adenylyl cyclase (sAC) synthesizes cyclic adenosine monophosphate (3',5'-cAMP). Phosphodiesterase (PDEi) is inactivated by binding of inhibitor (i) and cyclic adenosine monophosphate (3',5'-cAMP) does not inactivate and accumulates, stimulating sperm motility.

léčiva při astmatu a dalších respiračních onemocněních.

Pomocí umělé aktivace dojde k aktivaci pohybu u nezralých spermií, které se po izolaci z varlat nehýbou. Tyto pohyblivé spermie jsou následně použity pro IVF. Aktivace pohybu spermií je výrazně zviditelná a usnadní jejich výběr ze vzorku (a zkrátí tak dobu výběru spermií). Navíc u mnoha vzorků krvavé varleční tkáně s pouze malým počtem spermií byly spermie identifikovány až po aktivaci. Z tohoto důvodu se

někdy aktivace spermií používá i v diagnostických vzorcích TESA (testicular sperm aspiration) [22].

Indikace k použití aktivace pohybu

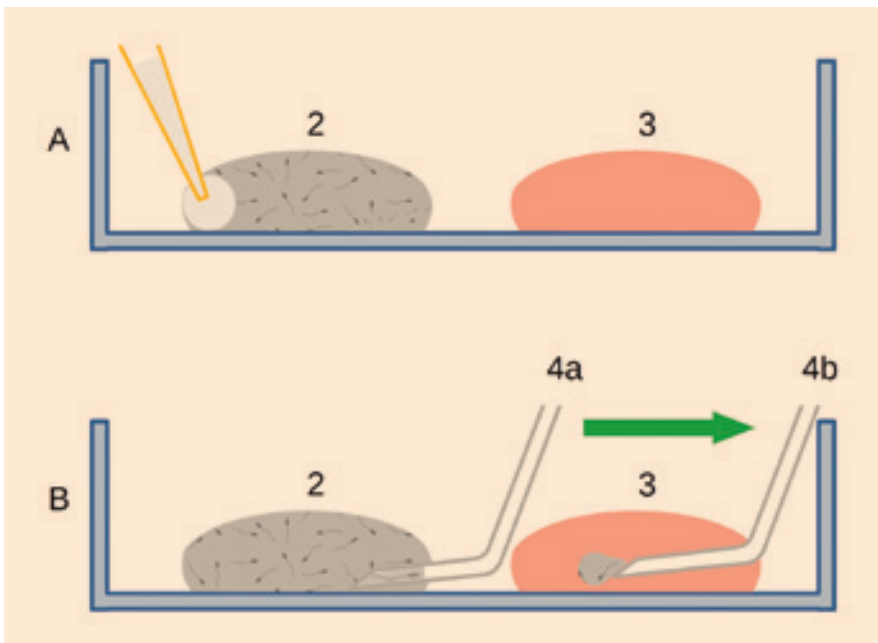
Indikací umělé aktivace pohybu spermií je TESE [23,24]. Ošetření testikulárních spermií získaných TESE teofylinem vedlo ke zvýšení klinické pregnancy rate z 23 % na 53 % [25].

Další indikací použití aktivace pohybu jsou případy těžké asthenozoo-

spermie [26], případně nekrozoospermie [27]. Velice efektivní je také tato metoda při manipulaci s rozmraženými spermii po TESE [25].

Potenciální rizika použití metody

Do současné doby nebyl publikován případ vrozené vady v souvislosti s použitím umělé aktivace pohybu spermií. Aydos a Aydos poukázali na potenciální riziko teratogenního účinku dimetylxanthinů [29] s odkazem na publikaci o vý-



Obr. 3. Obrázek znázorňuje postup aktivace pohybu spermií pomocí inhibitoru fosfodiesterázy.

A – Petriho miska umístěná na vyhřívané desce obsahuje kapku suspenze spermií (2) a kapku čistého média (3). Do kapky suspenze spermií je pipetou (1) odměřen roztok inhibitoru, který je aplikován k jedné straně kapky suspenze.

B – Po aktivaci spermie jsou pohyblivé spermie sbírány ICSI pipetou (4a, b) a přeneseny do kapky čistého média.

Fig. 3. The figure shows procedure for activating sperm movement using a phosphodiesterase inhibitor.

A – Petri dish placed on a heated plate contains a drop of sperm suspension (2) and a drop of clean medium (3). Inhibitor solution is measured into a drop of sperm suspension with a pipette (1), which is applied to one side of the drop of suspension.

B – After sperm activation, motile spermatozoa are collected with an ICSI pipette (4a, b) and transferred to a drop of clean medium.

skytu vrozených vad u myší vystavených vysokým dávkám (stovky miligramů na kilogram a den) paraxanthinu (1,7-dimethylxantin) v průběhu březosti [29]. Při použití této metody je důležité nevystavovat oocyty těmto látkám a pečlivě odstranit methylxanthin z kultivačního média, ve kterém se časná embrya vyvíjí [27]. Novější publikace zjistila, že paraxanthin není mutagenní ani genotoxickou látkou [30]. Pro bezpečnost aplikace látek ze skupiny dimethylxanthinů svědčí i široké používání léků z této skupiny v humánní medicíně bez teratogenních účinků. Pro umělou aktivaci pohybu spermie se navíc využívají nízké koncentrace aktivní látky a jejich působení na spermie je velmi krátkodobé, využívá se

časově omezeného efektu přechodného vzestupu cAMP.

Doporučený postup

V současné době je dostupný preparát GM501 SpermMobil (PLANER LIMITED, GYNEMED Medizinprodukte GmbH & Co. KG), založený na účinku inhibitoru fosfodiesterázy teofylinu [31], který se jinak používá také pro léčbu astmatu [32] a přirozeně se nachází např. v kakaových bobech [33] nebo čajových lístcích [34].

Roztok GM501 SpermMobil je zahřát na 37 °C, naekvilibruje se v atmosféře se zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého. Na topnou desku (37 °C) je umístěna Petriho miska s kapkou suspenze spermií v médiu pro přípravu spermií o objemu

cca 30–40 μ l. Přidá se 3–4 μ l zahřátého roztoku GM501 SpermMobil, a to z jedné strany, opačné, než ze které mají být nasávány spermie. Po 10 min je možno nabírat aktivované spermie (aktivační účinek nastoupí po několika minutách a trvá až 1 hod). Nabrané spermie jsou přeneseny s minimem tekutiny do kapky čistého média (obr. 3).

Závěr

Umělá aktivace pohybu spermií představuje účinný a bezpečný postup pro selekci vitálních spermií schopných oplodnit oocyt a umožnit vývoj embrya v případech, kdy není možno získat spontánně pohyblivé spermie.

Literatura

1. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM et al. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril* 1990; 53(4): 715–722. doi: 10.1016/s0015-0282(16)53470-0.
2. Imoedemhe DA, Sigue AB, Pacpaco EA et al. Successful use of the sperm motility enhancer 2-deoxyadenosine in previously failed human *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9(1): 53–56. doi: 10.1007/BF01204115.
3. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril* 1992; 58(6): 1185–1190. doi: 10.1016/s0015-0282(16)55567-8.
4. Sousa AP, Amaral A, Baptista M et al. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One* 2011; 6(3): e18112. doi: 10.1371/journal.pone.0018112.
5. Oseguera-López I, Ruiz-Díaz S, Ramos-Ibeas P et al. Novel techniques of sperm selection for improving IVF and ICSI outcomes. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7: 298. doi: 10.3389/fcell.2019.00298.
6. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N et al. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update* 2015; 21(6): 711–726. doi: 10.1093/humupd/dmv042.
7. Verheyen G, Popovic-Todorovic B, Tournaye H. Processing and selection of surgically-retrieved sperm for ICSI: a review. *Basic Clin Androl* 2017; 27: 6. doi: 10.1186/s12610-017-0050-2.
8. Zhu J, Tsirigotis M, Pelekanos M et al. In vitro maturation of human testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11(1): 231–232. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019030.
9. Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J An-*

- drol 2003; 24(6): 790–803. doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb03123.x.
10. Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1–2): 25–38. doi: 10.1071/rd05120.
11. Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE et al. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(12 Pt B): 2610–2620. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.07.013.
12. Vadnais ML, Aghajanian HK, Lin A et al. Signaling in sperm: toward a molecular understanding of the acquisition of sperm motility in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 2013; 89(5): 127. doi: 10.1095/biolreprod.113.110163.
13. Tash JS, Means AR. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol Reprod* 1982; 26(4): 745–763. doi: 10.1095/biolreprod26.4.745.
14. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28(1): 75–104. doi: 10.1095/biolreprod28.1.75.
15. Kaupp UB, Strünker T. Signaling in sperm: more different than similar. *Trends Cell Biol* 2017; 27(2): 101–109. doi: 10.1016/j.tcb.2016.10.002.
16. Pereira R, Sá R, Barros A et al. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl* 2017; 19(1): 5–14. doi: 10.4103/1008-682X.167716.
17. Lefèvre L, de Lamirande E, Gagnon C. Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 67(2): 423–430. doi: 10.1095/biolreprod67.2.423.
18. Tardif S, Madamidola OA, Brown SG et al. Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. *Hum Reprod* 2014; 29(10): 2123–2135. doi: 10.1093/humrep/deu196.
19. Ibis E, Hayme S, Baysal E et al. Efficacy and safety of papaverine as an *in vitro* motility enhancer on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2021; 38(6): 1523–1537. doi: 10.1007/s10815-021-02160-x.
20. Lefèvre L, de Lamirande E, Gagnon C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* 2000; 21(6): 929–937.
21. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl* 2006; 27(1): 45–52. doi: 10.2164/jandrol.05079.
22. Taşdemir I, Taşdemir M, Tavukçuoğlu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(2): 90–92. doi: 10.1007/BF02766832.
23. Liu J, Nagy Z, Joris H et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995; 10(10): 2630–2636.
24. Esfandiari N, Javed MH, Gotlieb L et al. Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection – analysis of 10 years' data. *Int J Fertil Womens Med* 2005; 50(4): 187–192.
25. Ebner T, Tews G, Mayer RB et al. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. *Fertil Steril* 2011; 96(6): 1331–1336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.041.
26. Ebner T, Shebl O, Mayer RB et al. Healthy live birth using theophylline in a case of retrograde ejaculation and absolute asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2014; 101(2): 340–343. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.006.
27. de Mendoza MV, González-Utor AL, Cruz N et al. *In situ* use of pentoxifylline to assess sperm vitality in intracytoplasmic sperm injection for treatment of patients with total lack of sperm movement. *Fertil Steril* 2000; 74(1): 176–177. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00559-8.
28. Aydos K, Aydos OS. Sperm selection procedures for optimizing the outcome of ICSI in patients with NOA. *J Clin Med* 2021; 10(12): 2687. doi: 10.3390/jcm10122687.
29. York RG, Randall JL, Scott WJ Jr. Teratogenicity of paraxanthine (1,7-dimethylxanthine) in C57BL/6J mice. *Teratology* 1986; 34(3): 279–282. doi: 10.1002/tera.1420340307.
30. Purpura M, Jäger R, Falk M. An assessment of mutagenicity, genotoxicity, acute-, subacute and subchronic oral toxicity of paraxanthine (1,7-dimethylxanthine). *Food Chem Toxicol* 2021; 158: 112579. doi: 10.1016/j.fct.2021.112579.
31. GM501 SpermMobil – Firemní návod. 2023 [online]. Available from: [https://mail.planer.com/_80258426005B6A5E.nsf/0/5D7B42F886764AFB8025856000357A88/\\$File/Gi140_V1-Sperm-Mobil.pdf](https://mail.planer.com/_80258426005B6A5E.nsf/0/5D7B42F886764AFB8025856000357A88/$File/Gi140_V1-Sperm-Mobil.pdf).
32. Barnes PJ. Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(8): 901–906. doi: 10.1164/rccm.201302-0388PP.
33. Apgar JL, Tarka SM Jr. Methylxanthine composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products and their uses. In: Spiller GA (ed). *Caffeine*. Boca Raton (FL): CRC Press 1998: 171.
34. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer 1991; 51: 391–419.

ORCID autorů

P. Trávník 0000-0002-2966-923X
 M. Jeřeta 0000-0003-1778-3454
 R. Hüttelová 0009-0001-1877-1060
 R. Křen 0009-0002-3534-7816
 L. Landsmann 0000-0001-5984-1232
 A. Nesvadbová 0000-0001-7854-4268
 G. Tauwinklová 0009-0001-3024-6357

Doručeno/Submitted: 20. 10. 2023

Přijato/Accepted: 24. 10. 2023

*prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.
 REPRAMEDA s.r.o.
 Studentská 812/6
 625 00 Brno
 ptravnik@reprameda.cz*

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

Publication ethics: The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.

Konflikt zájmů: Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.

Conflict of interests: The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.