

Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., BIOCEV
Laboratoř reprodukční biologie



Urologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a
1. LF UK



Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice



Nemocnice Motol a 2. LF UK



Metodika schválená Ministerstvem zdravotnictví ČR:

Analýza bioenergetického metabolismu spermií mužů

Autoři

Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D. (podíl práce 25 %)
Bc. Barbora Bryndová (podíl práce 25 %)
RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D. (podíl práce 15 %)
doc. RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D. (podíl práce 15 %)
MSc. Vishma Pratap Sur, Ph.D. (podíl práce 5 %)
MUDr. Ludmila Boublíková, Ph.D. (podíl práce 5 %)
Prof. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D. (podíl práce 5 %)
MUDr. Libor Zámečník, Ph.D., FEBU, FECSM, MBA (podíl práce 5 %)

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu:

**Sledování parametrů plodnosti a stavu testikulární tkáně u pacientů s tumorem varlete
v závislosti na jejich terapii
(NU 20-03-00309)**

Návrh uživatelů, pro které je výsledek stanoven jako doporučený k využití v praxi

Metodika byla vytvořena na základě výsledků analýzy energetického metabolismu a vlivu testikulárního germinálního tumoru (Testicular Germ Cell Tumour - TGCT) na změny v oxidativní fosforylaci spermií a variabilitu efektu inhibitorů komplexů dýchacího řetězce. Metodika byla optimalizována pro vzorky spermií po rozmrazení, má sloužit jako nástroj pro rutinní klinické zpracovávání vzorků a být využita pro standardizované nastavení k hodnocení parametrů vzorků spermií u pacientů s TGCT.

Metodika je plánována být implementována do diagnosticko-léčebného managementu pacientů s TGCT, se zaměřením na zachování fertility ve třech subjektech (VFN, FTN, FN Motol).

OBSAH

1) Cíl metodiky	4
2) Úvod	4
3) Popis metodiky	5
4) Srovnání novosti postupů	9
5) Popis uplatnění metodiky	10
6) Socio-ekonomické aspekty metodiky.....	10
7) Seznam použité literatury	11
8) Seznam publikací předcházející certifikované metodice	12

Název metodiky: Analýza bioenergetického metabolismu spermií mužů

1. Cíl: Standardizace metodiky pro hodnocení energetického metabolismu spermií mužů pomocí Extracellular Flux (XF) analyzátoru

2. Úvod

Spermie jsou k oplození specializované buňky a pro svoji funkci potřebují stabilní a nenarušený přísun energie, která vzniká především prostřednictvím oxidativní fosforylace (OXPHOS) a glykolýzy. Míra využití těchto bioenergetických drah ve spermiích je druhově specifická a liší se v různých vývojových a fyziologických stádiích. Bylo prokázáno, že u lidských spermií je OXPHOS dominantní metabolickou dráhou pro tvorbu ATP v procesu diferenciaci tzv. spermiogeneze, během zrání (maturaci) a v pohyblivosti (motilitě) spermií. Zatímco glykolýza, je přednostně využívána k podpoře specifických funkcí jako je kapacitace (finální stádium maturace) a akrozomální reakce spermií (nutné k průniku spermie obalu vajíčka), které vyžadují větší množství energie dostupné v určitých časových intervalech (du Plessis et al., 2015; Tourmente et al., 2022). Navíc se ukázalo, že ve fyziologii spermií hraje důležitou roli také metabolická dráha oxidace mastných kyselin (Kuang et al., 2021). Navzdory nízkému počtu mitochondrií (Hirata et al., 2002) a sníženému obsahu cytoplazmy (Irigoyen et al., 2022) jsou spermie vysoce metabolicky aktivní buňky. To potvrzuje i skutečnost, že nejhodnější jsou v proteomu spermií zastoupeny proteiny související s energetickým metabolismem (Amaral et al., 2013). Je zřejmé, že dysregulace bioenergetických drah ve spermiích může přímo narušovat mužskou plodnost. Snížená plodnost je globálním problémem a celosvětově v současné době trpí neplodností každý šestý pár (“Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021”). Z těchto případů nelze u 72 % identifikovat pomocí současných diagnostických nástrojů příčinu a jsou klasifikovány jako tzv. nevysvětlitelná (idiopatická) neplodnost (Schubert et al., 2019).

Je známo, že hlavní příčiny mužské neplodnosti souvisejí s poruchami tvaru (morfologie) a pohyblivosti spermií, přičemž snížená pohyblivost spermií může být spojena až s 60 % případů idiopatické mužské neplodnosti (Tüttelmann et al., 2006). Motilita spermií je přímo závislá na přísunu energie ve formě ATP, který vzniká při výše jmenovaných metabolických procesech. OXPHOS a glykolýza mohou být analyzovány například pomocí Extracellular flux analyzér Seahorse (Agilent). Tato technologie je díky fungování v reálném čase, využití nativních vzorků bez nutnosti aplikace fluorescenčních značek a vysoké citlivosti představuje nástroj využitelný v klinické praxi. Jednou z indikací mužské neplodnosti může být diagnóza testikulárního germinálního tumoru (Testicular Germ Cell Tumour – TGCT). Incidence tohoto nádoru je ve většině zemí na vzestupu (“Cancer Over Time,” n.d.; Gurney et al., 2019) a vzhledem k zásadnímu vlivu této patologie na funkční parametry spermií (Marchiani et al., 2023) je třeba komplexní analýza spermií včetně měření energetického metabolismu. I když je tato technologie rozšířena v oboru imunologie i výzkumu rakoviny, v reprodukční biologii není tento analytický přístup dosud standardizován a využíván.

Hlavním cílem metodiky pro bioenergetickou analýzu lidských spermií bylo nastavit parametry za účelem rozšíření portfolia diagnostických přístupů v klinické andrologii. Aktuálně se tento přístup v praxi nepoužívá, proto byla metodika testována na různých úrovních: i) efekt

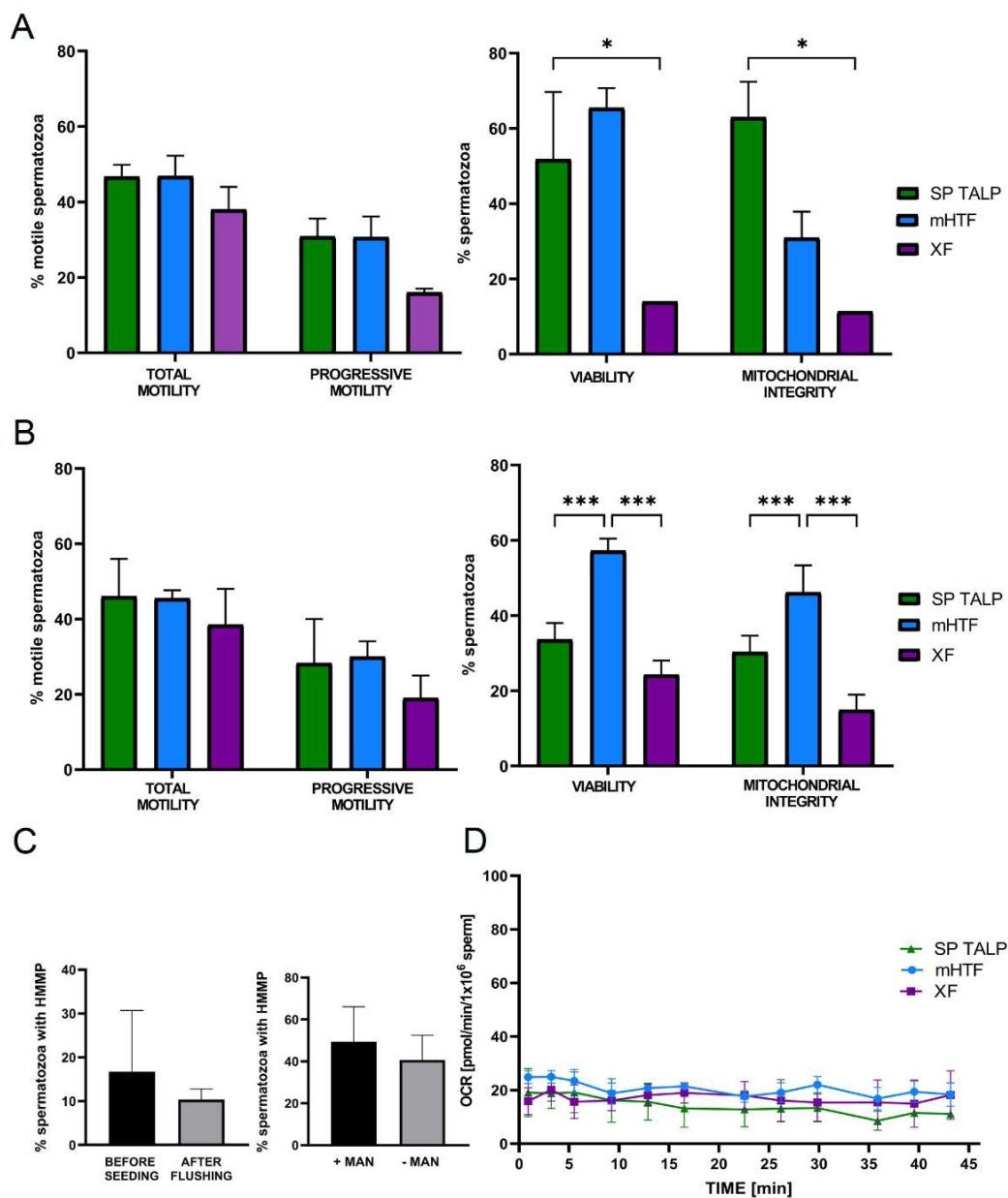
použitého měřicího média na kvalitativní parametry spermií; ii) efekt použitého měřicího média na spotřebu kyslíku jako ekvivalentu míry OXPHOS; iii) definování vhodné koncentrace inhibitorů ETC; iv) komparativní analýza míry OXPHOS a glykolýzy (zdravý dárce – normozoospermic vs. pacient TGCT). Předkládané komplexní nastavení protokolu pro měření doplněné o detailní návod pro korektní přístup ke zpracování dat přináší nový nástroj pro diagnostiku a personalizovanou léčbu neplodnosti.

3. Popis metodiky

Nastavení standardního „work-flow“ pro hodnocení bioenergetického metabolismu spermií

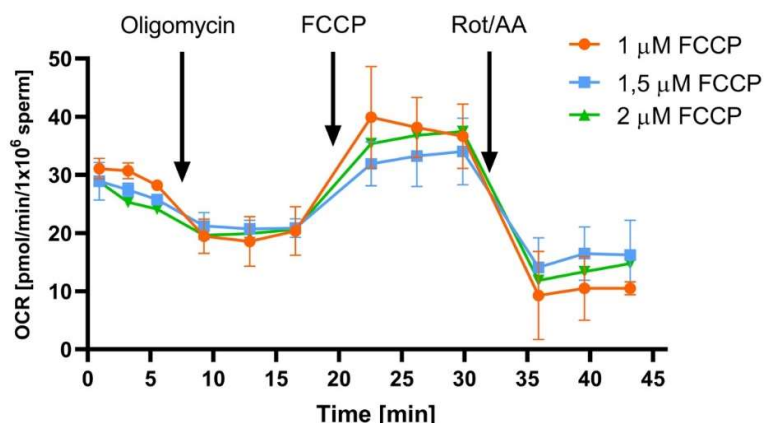
Analýza spermií pomocí „extracellular flux“ (XF) analyzátoru probíhá ve speciálních mikrotritračních destičkách dodávaných výrobcem přístroje. Spermie ať v nativním stavu nebo po rozmrazení musí být promyty a preinkubovány v manipulačním médiu, které poskytuje spermiím vhodné extracelulární prostředí. To je pak dále využito i pro měření. Dle pokynů výrobce v médiu nesmí být přítomen hydrogenuhlíčan sodný a další pufovací složky typu HEPES musí být omezeny na polovinu původní koncentrace. V současné době se v laboratořích nevyužívá pouze jedno standardní médium pro zpracování spermií. Výběr média pro manipulaci se spermiemi je přitom zásadní, neboť používaná média mohou ovlivnit funkční parametry spermií jako je viabilita a mitochondriální aktivita. Tento negativní efekt může mít dopad na výsledky samotného měření. Výsledky testování vlivu tří dále specifikovaných médií na parametry spermií v pre-analytické části měření energetického metabolismu jsou uvedeny v grafu č. 1A. Pro účely metodiky bylo testováno 1. XF médium doporučené výrobcem XF analyzátoru; 2. HTF (human tubal fluid) medium používané pro práci s humánními spermiemi v *in vitro* podmínkách; a 3. Sp-TALP medium (modifikovaný Tyrodův roztok) využívaný pro manipulaci se savčími spermiemi obecně. Shodné parametry (motilita, viabilita a mitochondriální aktivita) u testovaných médií byly analyzovány v post-analytické části (graf č. 1B). Spermie jsou během analýzy vázány na dno jamek destičky pomocí vodného roztoku konkanavalinu A (viz příloha – Protokol), což je lektin vázající galaktózové a manózoové zbytky glykoproteinů nacházejících se na hlavičce spermií. Efekt vazby spermií na konkanavalin A, který by mohl zasahovat do výsledků vlastního měření, nebyl prokázán jako signifikantní, stejně jako efekt následného výplachu pomocí manózoového pufru (graf č. 1C). Finálně byla jednotlivá média testována během analýzy energetického metabolismu a získané bazální hodnoty spotřeby kyslíku (Oxygen Consumption Rate – OCR) spermií během analýzy v jednotlivých médiích jsou specifikovány v grafu č. 1D.

Z důvodu zvýšení efektivity měření bioenergetického metabolismu spermií bylo původní HTF médium modifikováno, aby byla snížena jeho pufrací kapacita. Této vlastnosti média bylo docíleno snížením koncentrace HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonové kyseliny) na 5 mM, což je důležité z hlediska principu fungování XF analyzátoru, a tím přesnosti dosažených výsledků. Výstupem bylo inovativní složení modifikovaného (mHTF) media, které se prokázalo jako nejvhodnější pro přípravu i analýzu spermií pomocí XF analyzátoru a bylo dále používáno v experimentální části, kde byl zjišťován vliv patologie – TGCT na energetický metabolismus spermií.



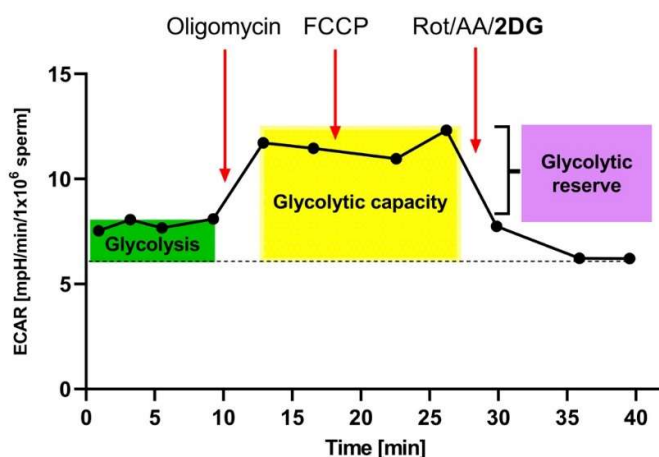
Graf č. 1. Testování vlivu použitých médií (Sp-TALP, HTF, XF) na funkční parametry spermií v podmínkách *in vitro* v pre-analytické (A) a post-analytické (B) fázi měření energetického metabolismu pomocí XF analyzátoru. Vliv vazby spermií pomocí konkanavalinu A a výplachu spermií pomocí methylmanóзовého pufru na mitochondriální membránový potenciál spermií (C). Vliv testovaných médií na hodnoty bazálního hodnoty spotřeby kyslíku (OCR) (D).

Vzhledem k inovativnímu charakteru metody, vysoké citlivosti a absenci v klinické humánní andrologii byly testovány tři následující koncentrace rozpřahovače protonového gradientu v mitochondriích – FCCP (1; 1,5 a 2 μM) používaného při MitoStress protokolu. Graf č. 2 dokládá, že optimální koncentrace FCCP je 1 μM , která byla následně využívána ve všech dalších měřeních. Vzhledem k všeobecně nejvýraznější reakci spermií na tuto látku byla daná titrace nejzásadnější.



Graf č. 2. Titrace koncentrace mitochondriálního rozpřahovače FCCP ve vztahu k OCR.

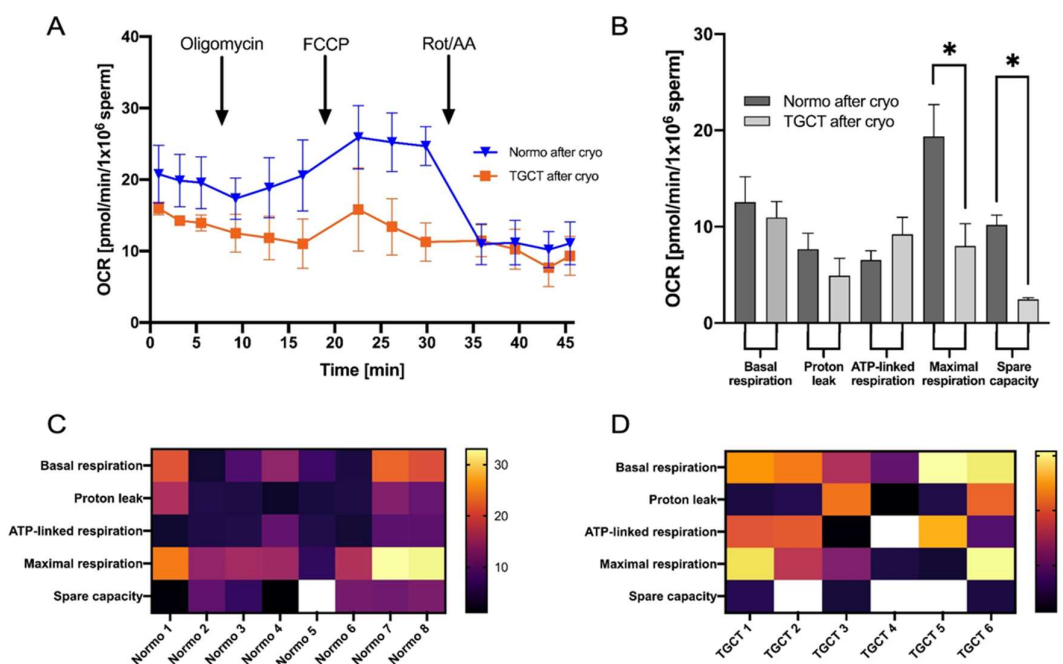
Standardně využívaný protokol pro Mitostress test byl rozšířen o finální přídavek 2-deoxyglukózy, tzv. kombinovaný protokol, což umožňuje analýzu acidifikace média (extracellular acidification rate – ECAR) a z něho derivovaných parametrů jako glykolytická aktivita, glykolytická kapacita a glykolytická rezerva (Graf č. 3). Tato modifikace přináší oproti hodnocení ECAR během MitosStress test protokolu relevantní výpočet uvedených parametrů, což je v souladu s aktuálním doporučení výrobce (Romero et al., 2021). Náš postup představuje nový a specifický přístup pro paralelní hodnocení OXPHOS a glykolýzy na jednom vzorku a v jedné jamce což přináší praktické význam pro vzorky spermií o nízké koncentraci jak u ejakulátů normozoospermiků tak pacientů s TGCT patologií.



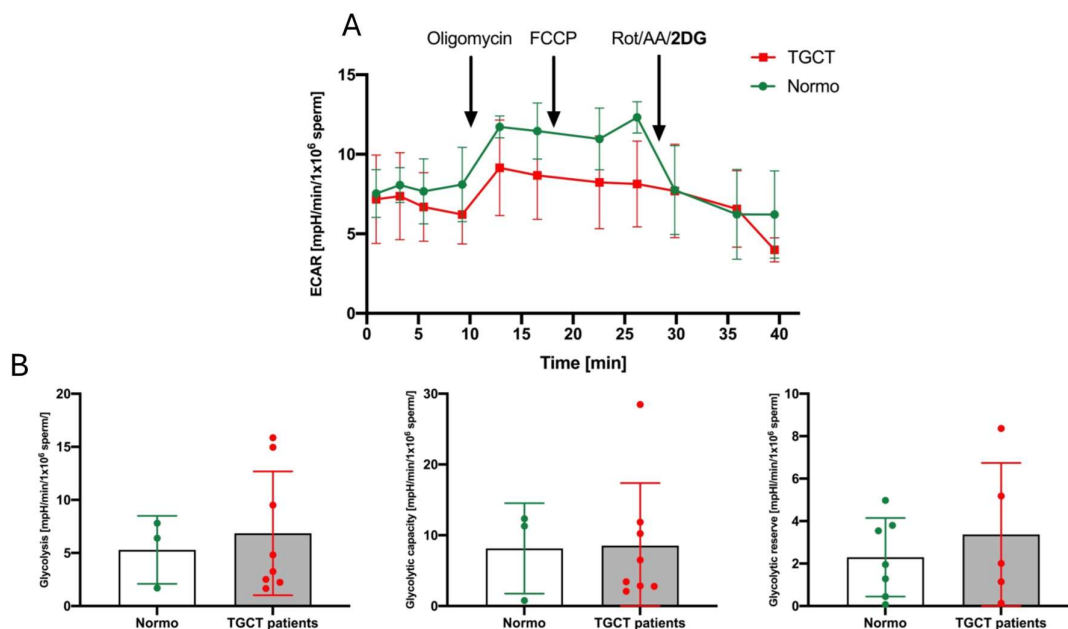
Graf č. 3. Reprezentativní příklad kombinovaného protokolu spolu s derivovanými parametry glykolytické aktivity.

V dalším kroce byl hodnocen mitochondriální bioenergetický stav kryokonzervovaných spermií pacientů s TGCT a porovnán s kontrolní skupinou normozoospermiků, aby byla zjištěna role mitochondriální dysfunkce v souvislosti se sníženou mírou přežití kryokonzervovaných spermií u pacientů s TGCT. Vliv patologického stavu u TGCT pacientů nebyl u průběhu křivky OCR signifikantní ($p \geq 0,05$), ale u parametrů počítaných ze

specifických bodů křivky byl statisticky významný rozdíl prokázán u maximální respirace a zbytkové kapacity (spare respiration) (viz. vysvětlení v příloze – Protokol) (Graf č. 4A, B). Tyto parametry byly v obou případech nižší u TGCT pacientů, což ukazuje na snížení schopnosti reagovat na stresové podmínky jako je kryokonzervace, která je jediným nástrojem jak uchovat spermie a zachovat plodnost pacienta do budoucna. Navíc se u vzorků pacientů prokázala vyšší interindividuální (mezi jedinci) variabilita (Graf č. 4C, D). U parametrů kalkulovaných z ECAR byly hodnoty obdobné u pacientů a zdravých dárců tzv. normozoospermiků tedy bez statistické significance. U křivky ECAR je vidět snížená bazální hodnota u TGCT pacientů s obdobným průběhem měření v dalších úsecích protokolu (Graf č. 5A, B).



Graf č. 4. Porovnání průběhu OCR hodnot během Mitostress test protokolu u pacientů s TGCT a normozoospermických dárců (A). Derivované parametry z měření OCR Mitostress test protokolem u pacientů a normozoospermických dárců (B). Interindividuální variabilita OCR derivovaných parametrů normozoospermiků a TGCT pacientů reprezentovaná heatmapou (C, D).



Graf č. 5. Porovnání průběhu ECAR hodnot měřených při využití kombinovaného protokolu pro Mitostress test u pacientů s TGCT a normozoospermických dárců (A). Derivované parametry z ECAR hodnot u pacientů a normozoospermických dárců (B).

Vzhledem k relativně vysokému výskytu idiopatickému snížení plodnosti je vhodné zařadit do oboru andrologie citlivější a specifitější analýzy, založené na měření bioenergetického metabolismu. V posledních letech je bráno na zřetel hodnocení vajíček tzv. oocytů a embryí. Tento trend jde paralelně s velkým nárůstem intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI), kdy pro tuto metodu je za potřebí minimum spermií. Avšak recentní metaanalýza ukázala, že klinické výsledky metod ICSI versus oplození v kultivační jamce, tzv. IVF (*in vitro* fertilizace) jsou na podobné úrovni (Wang et al., 2024) avšak je doloženo, že spermie se významně podílí na úspěšnosti fertilizace a kvalitě embrya (Vallet-Buisan et al., 2023). Bohužel, aktuální stav, kdy je k oplození využívána ve většině případů metoda ICSI, upozadil analýzu spermií a vývoj nových metod hodnocení funkčních parametrů.

4. Srovnání novosti postupů

Nedostatek studií energetického metabolismu lidských spermií přináší prostor pro zavedení sjednocené metodiky základního měření energetického metabolismu jak u zdravých (normozoospermických) dárců tak u pacientů zatížených patologickými stavy jako je TGCT. XF analyzátor je uživatelsky vstřícným řešením pro měření energetického metabolismu řady typů buněk a tkání. Většina studií v oblasti reprodukční biologie sleduje energetický metabolismus převážně myších spermií, ovšem XF analyzátor je užíván při analýze dat neplnohodnotně či chybně. Navíc u myšího modelu jsou hodnoceny spermie z nadvarlete tzv. epididymální nikoli ejakulované, a tím pádem je ignorován vliv semenné plazmy. Protokoly pro analýzu energetického metabolismu se liší podle typu buněk i cíle pozorování. Vzhledem k absenci standardizovaného protokolu pro lidské spermie předložená metodika přináší novou optimalizaci měření energetického metabolismu lidských spermií za využití XF analyzátoru.

S využitím předloženého kombinovaného protokolu, optimalizovaného složení měřicího média a koncentrace jednotlivých inhibitorů je umožněno paralelně sledovat kapacitu OXPHOS i glykolýzy. Vzhledem k tomu, že XF analyzátor představuje metodu pro měření spotřeby kyslíku a změn pH v médiu s přisedlými buňkami, předložená metodika předkládá způsob imobilizace a přichycení spermií na analyzovanou destičku pomocí konkanavalinu A. Tato metoda zároveň neinterferuje s měřením ani s funkčními parametry spermií. Součástí metodiky je i výplach imobilizovaných přichycených spermií pomocí manóзовého pufru, který účinně a bez negativních vlivů umožňuje uvolnění spermií zpět do média. Tím je zajištěna možnost následné analýzy vzorku po provedení měření energetického metabolismu. Tento metodický postup a měření funkčních parametrů spermií (motility, viabilita, mitochondriální aktivita) nebyl doposud publikován, a proto námi předložený metodika je unikátní a přináší nový nástroj ke standardizaci protokolu měření energetického metabolismu spermií mužů.

5. Popis uplatnění metodiky

Varianta XF analyzátoru – XFp pro 8 jamkové destičky je nejmenším typem s integrovaným displejem. Představuje vhodnou alternativu pro instalaci a použití v klinické laboratoři. Původní protokol trvající hodinu a půl byl v rámci předložené metodiky modifikován a otestován. Přínosem modifikace je zkrácení délky měření na 45 minut, což je zvyšuje životaschopnost (viability) spermií v *in vitro* podmínkách a potenciál klinického využití. Uživatelský manuál, který zahrnuje detailní popis přípravy médií, vzorku spermií, inhibitorů a práci s naměřenými daty představuje nové řešení pro analýzu metabolického stavu spermií na základě měření OXPHOS a glykolýzy. Post-analytická fáze tvoří významnou část vhodné diagnostiky (Šálek et al., 2016) a pro porovnání výsledků jednotlivých pacientů a stanovení „zdravé“ skupiny pacientů je potřeba zavést normalizovaný protokol, který bude následovat stejný postup a podmínky měření. Vzhledem k tomu, že kombinovaný protokol v předložené metodice přináší možnosti paralelního měření OXPHOS a glykolytické aktivity u spermií, zajišťuje plnohodnotný obraz energetického metabolismu spermií se sníženým množstvím vzorku na minimum, což je významné zvláště u vzorků pacientů s TGCT. S využitím jednoduchého výpočtu jednotlivých parametrů je možné stanovit celkovou metabolickou hodnotu vzorku a porovnat individuálně pacienty v měřené skupině či v průběhu léčby. Výsledné parametry, jako jsou bazální respirace, glykolytická rezerva či maximální respirace, tak poukazují na reálný stav vzorku spermií a reflektuje jejich funkční kvalitu a fertilizační schopnost. Defekty v energetickém metabolismu jedné nebo obou metabolických drah tak přispěje k odhalení souvisejících příčin neplodnosti.

6. Socio-ekonomické aspekty metodiky

K úspěšnému oplození vajíčka musí spermie vynaložit značné množství energie a pokrytí energetické potřeby je klíčovým parametrem jejich funkčnosti. Sledování metabolického profilu spermií představuje elegantní a účinný prostředek pro odhalení případných poruch v mitochondriálním i cytosolickém metabolismu, který může být příčinou snížené fertilizační schopnosti jedince. Využití XF analyzátoru přináší možnosti zavedení standardizovaného

protokolu pro analýzu parametrů definujících u spermií respiraci (OXPHOS) a glykolytickou aktivitu. Nmi předložený kombinovaný protokol umožňuje měření obou těchto metabolických dějů zároveň, čímž je umožněno měření vzorků s malým počtem spermií. Následná analýza dat je časově nenáročná a přináší rychlý a snadný nástroj pro odhalení případných metabolických poruch spermií a sledování kvality spermií v závislosti na průběhem léčby a rekonvalescence u pacientů s TGCT.

Obecný charakter parametrů spermií, daných WHO manuálem a hodnocených v rámci spermiogramu, se v řadě případů jeví jako nedostatečný z hlediska predikce reálného funkčního a fertilizačního potenciálu spermií. V aktuální doplněné verzi WHO manuálu mají již pevné místo pokročilé metody hodnocení kvality spermií jako je analýza integrity DNA či stanovení biochemických markerů. Předkládaná metodika přináší nový přístup do palety nástrojů pro hlubší analýzu spermií s vysokou informativní hodnotou a využití pro personalizovaný přístup k řešení a léčbě mužské neplodnosti. Personalizovaný přístup má pozitivní dopad na řešení idiopatické infertility a patologických stavů u onkologických pacientů s přesahem do metod užívaných pro zachování jejich reprodukčního potenciálu do budoucna.

7. Seznam použité literatury

- Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146, R163–R174. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>
- Cancer Over Time [WWW Document], n.d. URL <https://gco.iarc.fr/overtime> (accessed 5.20.24).
- du Plessis, S.S., Agarwal, A., Mohanty, G., van der Linde, M., 2015. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J. Androl.* 17, 230. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.135123>
- Gurney, J.K., Florio, A.A., Znaor, A., Ferlay, J., Laversanne, M., Sarfati, D., Bray, F., McGlynn, K.A., 2019. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries. *Eur. Urol.* 76, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.07.002>
- Hirata, S., Hoshi, K., Shoda, T., Mabuchi, T., 2002. Spermatozoon and mitochondrial DNA. *Reprod. Med. Biol.* 1, 41–47. <https://doi.org/10.1046/j.1445-5781.2002.00007.x>
- Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021 [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications-detail-redirect/978920068315> (accessed 5.20.24).
- Irigoyen, P., Pintos-Polasky, P., Rosa-Villagran, L., Skowronek, M.F., Cassina, A., Sapiro, R., 2022. Mitochondrial metabolism determines the functional status of human sperm and correlates with semen parameters. *Front. Cell Dev. Biol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.926684>
- Kuang, W., Zhang, J., Lan, Z., Deepak, R.N.V.K., Liu, C., Ma, Z., Cheng, L., Zhao, X., Meng, X., Wang, W., Wang, X., Xu, L., Jiao, Y., Luo, Q., Meng, Z., Kee, K., Liu, X., Deng, H., Li, W., Fan, H., Chen, L., 2021. SLC22A14 is a mitochondrial riboflavin transporter required for sperm oxidative phosphorylation and male fertility. *Cell Rep.* 35, 109025. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109025>
- Marchiani, S., Degl’Innocenti, S., Dabizzi, S., Tamburrino, L., Fino, M.G., Traini, G., Calamai, C., Maggi, M., Vignozzi, L., Baldi, E., Lotti, F., 2023. Semen Cryopreservation for Men Banking for Oligozoospermia, Cancers, and Other

- Conditions: 24 Years' Experience of an Italian Bank. *J. Clin. Med.* 12, 4657.
<https://doi.org/10.3390/jcm12144657>
- Romero, N., Swain, P., Neilson, A., Dranka, B.P., 2021. Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology.
- Šálek, T., Franeckova, J., Jabor, A., Friedecký, B., 2016. Postanalytická fáze a interpretace laboratorního testu (post-postanalytická fáze). *Klin. Biochem. Metab.* 24(45) 2016, 82–87.
- Schubert, M., Pérez Lanuza, L., Gromoll, J., 2019. Pharmacogenetics of FSH Action in the Male. *Front. Endocrinol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00047>
- Tourmente, M., Sansegundo, E., Rial, E., Roldan, E.R.S., 2022. Capacitation promotes a shift in energy metabolism in murine sperm. *Front. Cell Dev. Biol.* 10.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.950979>
- Tüttelmann, F., Luetjens, C.M., Cooper, T.G., Simoni, M., Nieschlag, E., 2006. Dependence of semen characteristics on abstinence time, testicular volume and hormones. *Endocr. Abstr.* 11.
- Vallet-Buisam, M., Mecca, R., Jones, C., Coward, K., Yeste, M., 2023. Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. *Hum Reprod Update.* 5;29(4):395-433. doi: 10.1093/humupd/dmad006. PMID: 36882116.
- Wang, Y., Li, R., Yang, R., Zheng, D., Zeng, L., Lian, Y., Hu, Y., Zhao, J., Liang, X., Li, W., Jianqiao, L., Tan, Li., Cao, Y., Hao, G., Wang, H., Zhang, H., Wang, R., Mol, B. W., Huan, H. 2024. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilisation for couples with infertility with non-severe male factor: a multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 40, (10430) 294-394,
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02416-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02416-9)

8. Seznam publikací předcházející certifikované metodice

- Levoux, J., Prola, A., Lafuste, P., Gervais, M., Chevallier, N., Koumaiha, Z., Kefi, K., Braud, L., Schmitt, A., Yacia, A., Schirmann, A., Hersant, B., Sid-Ahmed, M., Ben Larbi, S., Komrskova, K., Rohlena, J., Relaix, F., Neuzil, J., Rodriguez, AM., 2021. Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell. Metab.* 33(2), 283-299.e9. doi: 10.1016/j.cmet.2020.12.006
- Qasemi, M., Sur, V.P., Simonik, O., Postlerova, P., Skrobanek, P., Hradec, T., Boublikova, L., Zamecnik, L., Buchler, T., Neuzil, J., Komrskova, K., 2024. Sperm mitochondria dysfunction in response to testicular cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* 54(4), e14146. doi: 10.1111/eci.14146
- Simonik O, Bryndova B, Sur VP, Ded L, Cockova Z, Benda A, Qasemi M, Pecina P, Pecinova A, Spevakova D, Hradec T, Skrobanek P, Ezrova Z, Kratka Z, Kren R, Jeseta M, Boublikova L, Zamecnik L, Büchler T, Neuzil J, Postlerova P, Komrskova K. Bioenergetics of human spermatozoa in patients with testicular germ cell tumour. Submitted to *Mol. Hum. Rep.*