

## **Oblasť techniky**

Predložený vynález sa týka identifikácie súboru konkrétnych miRNA molekúl s cieľom určenia úspešnosti/neúspešnosti IVF (*in vitro* fertilizačného) procesu, ich využitia pri tvorbe diagnostického testu pri predikcii úspešnosti *in vitro* fertilizačného procesu u žien pri umelom oplodnení.

## **Doterajší stav techniky**

Zdravie ľudskej populácie je jedným z hlavných atribútov fungovania ľudskej spoločnosti. Vysoké spoločenské nároky kladené na človeka prinášajú veľa negatívnych dopadov na jeho celkové zdravie. V súčasnosti neplodnosť postihuje 48,5 milióna párov na svete. Vzhľadom k infertilite, ako celopopulačnému problému, sa v posledných dekádach významne zvýšil počet realizovaných cyklov asistovanej reprodukcie v klinickej praxi. Napriek množstvu technických vylepšení v rámci kultivácie embryí v podmienkach *in vitro*, a napriek vylepšeniu kultivačných médií, väčšina transferovaných embryí sa v maternici nie je schopná uhniezdiť (de Mouzon a kol., 2012). Relatívne nízku úspešnosť metód asistovanej reprodukcie preto vylepšujú transfery väčšieho počtu embryí v rámci IVF cyklu. Optimálna selekcia embrya v rámci IVF je rozhodujúcim krokom celej liečby. Na úspešnej implantácii sa okrem iných faktorov podieľa najmä vysokokvalitné embryo vhodné pre IVF proces. Kvalita embrya pre úspešnosť IVF procesu sa okrem základných morfológických znakov (sledovanie v embryoskope) nesleduje a nedagnostikuje. V súčasnosti používané rôzne selekčné a hodnotiace systémy kvality ľudských embryí pravdepodobne dosiahli svoj vrchol a už nemôžu zlepšiť výsledky asistovanej reprodukcie. Percento úspešnosti IVF procesu sa pohybuje na hranici 29 %. Je preto potrebné hľadať iný marker. Samotný oocyt môže predikovať významným spôsobom vývoj včasného embrya, keďže je dodávateľom RNA a celulárnych mechanizmov. Mnohé vedecké skupiny sa venujú štúdiu folikulárnej tekutiny a jej proteomickému zloženiu s cieľom predikcie kvality embryí (Kosteria a kol., 2017). Odber folikulárnej

tekutiny z jednotlivých folikulov je však technicky pomerne náročný a v klinickej praxi komplikovaný zákrok. Navyše pravdepodobnosť oplodnenia odobratých oocytov stále nedosahuje požadované percento, a preto ďalšie analýzy a embryologické techniky na tejto úrovni znásobujú ekonomické náklady.

Okrem analýzy markerov angiogenézy a vaskularizácie sa pozornosť vedeckej obce zameriava aj na štúdium nekódujúcich molekúl RNA, tzv. miRNA, ktoré post-transkripčne regulujú génovú expresiu u eukaryotov. Bolo potvrdené, že viac ako 130 miRNA je exprimovaných v ľudskej blastocyste a ich expresia sa líši v závislosti od ploidity a pohlavia embryí. Počas embryogenézy dochádza k značnému exprimovaniu špecifických miRNA molekúl, ktorých hladiny je možné detegovať aj v kultivačnom materiáli embrya aj počas jeho *in vitro* kultivácie. Kultivačné médiá sa po uskutočnení transferu embrya alebo zmrazení embrya stávajú „odpadovým materiálom“. Doteraz bolo publikovaných niekoľko štúdií sledujúcich vzťah non-perceptívneho aj receptívneho endometria v korelácii s vývojovou kompetenciou embrya v kultivačnom médiu a miRNA (napr. miR142-5p, miR146a-5p, miR21, miR19b, miR302c). Napriek tomu neboli doposiaľ opublikované štatisticky významné a relevantné výsledky, nesúrodosť ktorých môže vyplývať aj z využitia rôznych metodík analýzy miRNA. Doposiaľ nebola skúmaná prítomnosť, resp. neprítomnosť miRNA molekúl a ich vzájomný korelačný vzťah v biologickom materiáli žien v procese IVF a žien pri opakovaných implantačných zlyhaniach. Je preto viac než žiadúce vytvoriť algoritmus kombinácie viacerých biomarkerov miRNA molekúl, resp. iných nekódujúcich ncRNA, ktoré by mohli potenciálne určovať úspešnosť/neúspešnosť IVF procesu u žien. Využitím týchto informácií bude možné upresniť stav endometriálnej vnímavosti, obdobie vznikajúceho implantačného okna ako aj najvhodnejšieho času prenosu embrya v procese IVF. Implantácia ľudskeho embrya je zložitý a multifaktorálny proces. miRNA sú endogénne, evolučne konzervatívne, jednoreťazcové nekódujúce RNA molekuly obsahujúce 20-24 nukleotidov, ktoré post-transkripčne regulujú génovú expresiu u eukaryotov, vrátane cicavčích buniek (Asirvatham a kol., 2009; McCallie a kol., 2010; Mouillet a kol., 2015; Catalanotto a kol., 2016). V biologickej databáze miRBase je v súčasnosti evidovaných viac ako 250 ľudských miRNA. Viac ako 130 miRNA je exprimovaných v ľudskej blastocyste (McCallie a kol., 2010; Rosenbluth a kol., 2013, Chan a kol., 2018). Bolo tiež

potvrdené, že expresia miRNA sa v ľudskej blastocyste líši v závislosti od ploidity embryí, rovnako aj v závislosti od pohlavia embrya (Rosenbluth a kol., 2013). Bioinformatická analýza miRNA poukazuje na jej potenciálnu úlohu v rámci regulácie niekoľkých biologických ciest a bunkových funkcií, vrátane inhibície bunkového cyklu a tumor supresorových aktivít (Lee a kol., 2014). Avšak biologická úloha väčšiny miRNA nie je dodnes presne stanovená. Doteraz bolo publikovaných niekoľko štúdií sledujúcich vzťah vývojovej kompetencie embryí a miRNA. Konsenzus však dodnes nebol v tejto problematike prijatý. Táto nesúrodosť môže byť daná rôznymi metódami analýzy miRNA, časom odberu kultivačného média v závislosti na dni vývoja embrya, a množstvom ďalších faktorov. Okrem toho, počas delenia včasného embrya neustále prebieha syntéza a degradácia miRNA. Bolo dokázané, že miRNA sa dedia od matky a v rámci prvého rozdelenia zygoty dochádza k strate až 60 % miRNA (Tang a kol., 2007). K nárastu expresie miRNA dochádza znovu v štádiu blastocysty (Zhang a kol., 2016). Vďaka komplexnosti a vysokému počtu nezávislých procesov, ktoré prebiehajú počas delenia včasného embrya, je nepravdepodobné, aby jeden biomarker bol schopný predikovať vývojovú kompetenciu embrya v rámci programu *in vitro* fertilizácie. Je preto dôležité, aby sa realizované štúdie sústreďovali na stanovenie základnej kombinácie biomarkerov vyvíjajúceho sa embrya, ešte pred samotnou implantáciou embrya do maternice, ktoré by korelovali s výsledkom tehotnosti.

US2014296099 opisuje spôsoby detekcie expresie miRNA v kultivačnom médiu *in vitro* oplodnených embryí za účelom posúdenia pravdepodobnosti životaschopnosti embrya, a ďalej selektovať embryá pre následnú implantáciu do pacienta. Yang Qian et al. (J. Transl. Med., 16(1), 2018) opisujú identifikáciu miRNA ako biomarkerov pre opakované potraty a/alebo neúspešné implantácie na predikciu výsledku prenosu IVF embrya.

K ďalším faktorom multifaktoriálneho IVF procesu patrí perceptívne endometrium schopné interakcie s embryom a určenie implantačného okna. V súčasnosti sa na neinvazívne určenie perceptivity endometria využívajú najmä ultrazvukové markery – hrúbka, objem a krvný tok v endometriu (Bonilla-Musoles a kol., 2013). Pri určení implantačného okna sa jedná o časovo obmedzený jav, ktorý sa vyskytuje iba v obmedzenom časovom období sekrečnej fázy menštruačného cyklu, známom aj ako

"okno implantácie" (OI). Okno implantácie sa najčastejšie objavuje v krátkom období - 20. až 24. deň ovariálneho cyklu a obvykle trvá len dva dni. Dochádza v ňom k špecifickej regulácii expresie vybraných génov zapojených do aktivácie angiogenézy, vaskularizácie a imunitnej odpovede. Súčasné štúdie zamerané na nesprávnu vnímavosť endometria došli k záverom, že odlišná expresia biomarkerov, či už vo zvýšenej alebo zníženej miere, často vedie k poruchám perceptivity. Dochádza k posunu implantačného okna alebo v horšom prípade k jeho zániku. V dôsledku problematickej interpretácie a prediktívnej hodnoty dostupných testov sa v súčasnosti len v malej miere využívajú testy perceptivity endometria (ER) u infertilných žien, resp. u žien pred plánovaným umelým oplodnením (IVF). Zlyhanie implantácie v dôsledku non-perceptívneho endometria zostáva do dnešného dňa nevyriešeným problémom reprodukčnej medicíny a veľmi častou príčinou neplodnosti u inak zdravých žien. Za posledných 5 rokov je aj napriek neustále sa zvyšujúcej snahe o zlepšenie implantačného procesu v podmienkach *in vitro* percento miery úspešne implantovaných embryí na hranici 29 %. Selekcia správneho embrya, určenie perceptivity endometria a vhodného času implantácie v cykle ženy sú kľúčovými premennými v procese *in vitro* fertilizácie. Existujú patentované testy perceptivity endometria ako aj implantačného okna. Doteraz však nikto nepatentoval distribúciu konkrétnych kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl analyzovaných pomocou NGS (Next Generation Sequencing) pri určení biologickej kompetencie matky pri multifaktoriálnom zohľadnení jej variácie, resp. predikcie implantačnej úspešnosti IVF procesu v kombinácii so selekciou vysokokvalitného embrya v konkrétny deň IVF procesu.

Na svetovom trhu nie je prítomný diagnostický test, ktorý by do 24 hodín, na základe vyhodnotenia prítomnosti kombinácie kanonických a iso-miRNA molekúl v plazme ženy a v kultivačnom médiu embrya predikoval úspešnosť nasledujúceho IVF procesu a prognosticky selektoval vysokokvalitné embryo vhodné na IVF transfer. Cieľom vynálezu je zvýšiť úspešnosť IVF procesu pri umelom oplodnení a poskytnúť diagnostický test na predikciu úspešnosti IVF procesu.

## **Podstata vynálezu**

Predkladaný opis sa týka identifikácie súboru konkrétnych miRNA molekúl, čiže vytvorenia profilu miRNA s cieľom určiť úspešnosť/neúspešnosť IVF procesu. Okrem toho sa predložený opis týka možného využitia profilu miRNA pri tvorbe inovatívneho diagnostického neinvazívneho testu ako produktu personalizovanej medicíny pri predikcii úspešnosti *in vitro* fertilizačného procesu u žien podstupujúcich umelé oplodnenie. Diagnostický test zahŕňa dva nezávislé testy identifikácie prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov. Jeden test je Success test, v ktorom sa miRNA profil stanovuje z plazmy periférnej krvi ženy. Druhý test je CultMed test, v ktorom sa miRNA profil stanovuje z kultivačného média embrya (4. až 6. deň jeho vývoja). Štandardne sa stanovuje profil miRNA z kultivačného média embrya 5. deň vývoja. Kultivačné médium embrya môžeme nazvať „kultivačným odpadom“ alebo „odpadovým materiálom“.

Predložený vynález pojednáva o konkrétnych miRNA molekulách identifikovaných v plazme ženy a v kultivačnom médiu embrya. Konkrétne molekuly kanonických miRNA a iso-miRNA preukázali signifikantne rozdielne zastúpenie a distribúciu v plazme žien v skupine úspešného IVF procesu oproti skupine žien v konkrétny deň neúspešného IVF procesu. Distribúciu konkrétnych kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl (miRNA profil) v plazme je možné využiť pre diagnostiku v deň IVF procesu, na zhodnotenie biologickej kompetencie - pripravenosti, resp. nepripravenosti matky na IVF proces. Sekréciiu konkrétnych kanonických a iso-miRNA molekúl (miRNA profil) do kultivačného média embrya je možné využiť pre diagnostiku v deň IVF procesu a na zhodnotenie kompetencie, kvality embrya.

Presnosť predikcie IVF procesu bola overená pomocou štyroch nasledovných modelov:

Logistická regresia – model využívajúci logistickú funkciu (*Sigmoid*) a L2 regularizáciu pre binárnu klasifikáciu na základe predikčných miRNA molekúl

Random Forest – model využívajúci vlastnosti viacnásobne aplikovaných rozhodovacích stromov pre binárnu klasifikáciu na základe predikčných miRNA molekúl

Support Vector Machine (SVM) – komplexný model využívajúci nelineárnu metódu *rbf* spolu s ďalšími parametrami pre binárnu klasifikáciu predikčných miRNA molekúl

Stochastic gradient descent (SGD) – model využívajúci iteratívnu, náhodne inicializovanú metódu logistickej regresie spolu s SGD učením pre binárnu klasifikáciu na základe predikčných miRNA molekúl.

Podstatou vynálezu je neinvazívne testovanie úspešnosti IVF (*in vitro* fertilizačného) procesu zahŕňajúci dva nezávislé kroky:

- krok identifikácie a analýzy prognostických kanonických a iso-miRNA biomarkerov z plazmy periférnej krvi žien v deň IVF procesu (Success test), a
- krok prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov z kultivačného média embrya odobraného na 4. až 6. deň kultivácie embrya (CultMed test)

kde úspešný Success test vykazuje cut off hodnoty vybraných miRNA biomarkerov pri počte čítaní 1, ktoré sú  $\geq 1$ , a cut off hodnotu miRNA iso-hsa-let-7b-5p\_TGAGGTAGTATGTTGTGTGG pri počte čítaní 5, ktorá je  $\geq 5$ , a

úspešný CultMed test vykazuje cut off hodnotu vybraných miRNA biomarkerov pri počte čítaní 1, ktorá je  $\geq 1$ ,

a kde tieto hodnoty oboch testov predikujú úspešný IVF proces.

CultMed test s 95 % presnosťou AUC metódy zahŕňa: odber vzorky kultivačného média embrya; izoláciu všetkých miRNA, následne sekvenačnú analýzu a analýzu dát vybraných 14 miRNA: iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-423-5p, iso-hsa-miR-21-5p, iso-hsa-miR-486-5p, iso-hsa-miR-486-5p, iso-hsa-miR-25-3p, iso-hsa-miR-3613-5p, iso-hsa-miR-142-3p, iso-hsa-miR-664a-5p, iso-hsa-miR-151a-3p, iso-hsa-miR-92a-3p, iso-hsa-let-7a-5p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-100-5p; a určenie hodnoty počtu čítaní 14 miRNA biomarkerov z predchádzajúceho kroku.

Jedna analýza neinvazívneho testovania úspešnosti IVF zahŕňa identifikáciu prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov - Success test so 100 % senzitivitou a 100 % špecificitou, s priemernou presnosťou 4 rôznych modelov 88 %, uskutočnenú v nasledujúcich krokoch:

- Odber vzorky plazmy z periférnej krvi, ktorá bolo získaná od ženy;

- Izolácia všetkých miRNA, následná sekvenačná analýza a analýza dát vybraných 19 miRNA: iso-hsa-miR-126-3p so SEQ ID NO: 1, iso-hsa-let-7i-5p so SEQ ID NO: 2, iso-hsa-miR-342-3p so SEQ ID NO: 3, iso-hsa-let-7b-5p so SEQ ID NO: 4, iso-hsa-miR-132-3p so SEQ ID NO: 5, iso-hsa-miR-23b-3p so SEQ ID NO: 6, iso-hsa-miR-125a-5p so SEQ ID NO: 7, iso-hsa-miR-584-5p so SEQ ID NO: 8, iso-hsa-miR-127-3p so SEQ ID NO: 9, iso-hsa-miR-101-3p so SEQ ID NO: 10, iso-hsa-miR-151a-3p so SEQ ID NO: 11, iso-hsa-miR-92a-3p so SEQ ID NO: 12, iso-hsa-let-7b-5p so SEQ ID NO: 13, iso-hsa-miR-589-5p so SEQ ID NO: 14, iso-hsa-miR-652-3p so SEQ ID NO: 15, iso-hsa-miR-1307-3p so SEQ ID NO: 16, iso-hsa-miR-382-5p so SEQ ID NO: 17, iso-hsa-let-7b-5p so SEQ ID NO: 18, iso-hsa-let-7i-5p so SEQ ID NO: 19;
- Určenie hodnoty počtu čítaní u 19 miRNA biomarkerov z predchádzajúceho kroku.

Vo výhodnom uskutočnení, druhá časť analýzy neinvazívneho testovania úspešnosti IVF zahŕňa test analýzy identifikácie prognostických kanonických a iso-miRNA biomarkerov CultMed test so 100 % senzitivitou a 80 % špecificitou, s priemernou presnosťou 4 rôznych modelov 85 %, s nasledujúcimi krokmi:

- Odber vzorky kultivačného média embrya;
- Izolácia všetkých miRNA, následne sekvenačná analýza a analýza dát vybraných 17 miRNA: iso-hsa-let-7b-5p zo SEQ ID NO: 20, iso-hsa-miR-423-5p zo SEQ ID NO: 21, iso-hsa-miR-21-5p zo SEQ ID NO: 22, iso-hsa-miR-486-5p zo SEQ ID NO: 23, iso-hsa-miR-486-5p zo SEQ ID NO: 24, iso-hsa-miR-25-3p zo SEQ ID NO: 25, iso-hsa-miR-3613-5p zo SEQ ID NO: 26, iso-hsa-miR-142-3p zo SEQ ID NO: 27, iso-hsa-miR-664a-5p zo SEQ ID NO: 28, iso-hsa-miR-151a-3p zo SEQ ID NO: 29, iso-hsa-miR-92a-3p zo SEQ ID NO: 30, iso-hsa-let-7a-5p zo SEQ ID NO: 31, iso-hsa-let-7b-5p zo SEQ ID NO: 32, iso-hsa-miR-100-5p zo SEQ ID NO: 33, iso-hsa-miR-191-5p zo SEQ ID NO: 34, iso-hsa-let-7a-5p zo SEQ ID NO: 35, iso-hsa-let-7d-5p zo SEQ ID NO: 36;
- Určenie hodnoty počtu čítaní 17 miRNA biomarkerov z predchádzajúceho kroku.

Test analýzy identifikácie prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov Success test s 99 % presnosťou AUC ROC krivky modelu predikcie zahŕňa:

- Odber vzorky plazmy, ktorá bolo získaná od ženy;
- Izoláciu všetkých miRNA, následne sekvenačnú analýzu a analýzu dát vybraných 10 miRNA: iso-hsa-miR-126-3p, iso-hsa-let-7i-5p, iso-hsa-miR-342-3p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-132-3p, iso-hsa-miR-23b-3p, iso-hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-584-5p, iso-hsa-miR-127-3p, iso-hsa-miR-151a-3p.
- Určenie hodnoty počtu čítaní 10 miRNA biomarkerov z predchádzajúceho kroku.

Neinvazívne testovanie pomocou Success testu predikuje úspešnosť IVF procesu pri hraničnej hodnote 1, pričom vybrané miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 1$ , predikujú úspešný IVF proces a s hodnotou  $< 1$  predikujú neúspešný IVF proces. Hraničná hodnota 5 rozdeľuje vybrané miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 5$ , ako také, ktoré predikujú úspešný IVF proces a hodnoty  $< 5$  predikujú neúspešný IVF proces.

Spôsob neinvazívneho testovania pomocou CultMed testu s hraničnou hodnotou 1, pričom miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 1$  predikujú vysokokompetentné (kvalitné) embryo a s hodnotou  $< 1$  predikujú nízkokompetentné (nekvalitné) embryo.

V ďalšom kroku neinvazívneho testovania sú identifikované miRNA molekuly z plazmy ženy zoradené v závislosti od ich významu pre výsledok testu: iso-hsa-miR-126-3p, hsa-let-7i-5p, iso-hsa-miR-342-3p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-132-3p, iso-hsa-miR-23b-3p, iso-hsa-miR-125a-5p, iso-hsa-miR-584-5p, iso-hsa-miR-127-3p, iso-hsa-miR-101-3p, iso-hsa-miR-151a-3p, iso-hsa-miR-92a-3p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-589-5p, iso-hsa-miR-652-3p, iso-hsa-miR-1307-3p, iso-hsa-miR-382-5p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-let-7i-5p.

V nasledujúcom kroku neinvazívneho testovania sú identifikované miRNA molekuly z kultivačného média embrya zoradené v závislosti od ich významu pre výsledok testu: iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-423-5p, iso-hsa-miR-21-5p, iso-hsa-miR-486-



5p, iso-hsa-miR-486-5p, iso-hsa-miR-25-3p, iso-hsa-miR-3613-5p, iso-hsa-miR-142-3p, iso-hsa-miR-664a-5p, iso-hsa-miR-151a-3p, iso-hsa-miR-92a-3p, iso-hsa-let-7a-5p, iso-hsa-let-7b-5p, iso-hsa-miR-100-5p, iso-hsa-miR-191-5p, iso-hsa-let-7a-5p, iso-hsa-let-7d-5p.

Výhodou diagnostického testu je, že výsledok úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu je stanovený do 24 hod od odobratia biologického materiálu.

Hlavné predmety predkladaného vynálezu boli uskutočnené s využitím metódy masívneho-paralelného sekvenovania nekódujúcich malých RNA molekúl (miRNA) na sekvenačnej platforme Illumina. Na základe špecifickej analýzy dát (Explanatory Data Analysis) a metód strojového učenia (Machine Learning) s rôznymi modelmi bol vyselektovaný počet predikčných biomarkerov pre jednotlivé typy biologického materiálu.

Ďalšou nosnou časťou vynálezu je zoznam konkrétnych kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl identifikovaných z plazmy žien, a kanonických a iso-miRNA molekúl identifikovaných z kultivačného média embrya.

miRNA molekuly detegované Success testom sú uvedené v tabuľke 1.

**Tabuľka 1** Biomarkery miRNA predikcie úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu

<b>miRNA biomarkery predikcie úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu</b>	<b>Coef</b> (koeficient dôležitosti, významnosti)	<b>p</b> (p-value, H0: rozloženie dát vzhľadom na výsledok IVF je rovnaké)
iso-hsa-miR-126- 3p_CGTACCGTGAGAAATAATGCGT	11.520844189682128	0.0016884300209033492
iso-hsa-let-7i- 5p_TGTGGTAGTAGTTTGTGCTGTA	10.851674641148328	0.002221447605170916
iso-hsa-miR-342- 3p_TCTCACACAGAAATCGGACCCGTCT	10.765113798008537	0.0023025382184651104
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTTA	10.547046485537292	0.002521143336464067
iso-hsa-miR-132- 3p_TAACAGCCTACAGCCATGGTCGT	9.910931174089068	0.0032951920974540376
iso-hsa-miR-23b- 3p_GCACATTGCCAGGGATTACCACT	9.373481781376519	0.0041475542794915604
iso-hsa-miR-125a- 5p_TCCCTGAGACCTTTTAACCTGT	9.18292128014561	0.004503999211390216
iso-hsa-miR-584- 5p_TATGGTTTGCCTGGGACTG	9.094736842105265	0.004679908836274879
iso-hsa-miR-127- 3p_TCGGATCAGTCTGAGCTTGGCTTTT	9.094736842105265	0.004679908836274879
iso-hsa-miR-101- 3p_TACTACTGTGATAACTGA	8.845594649607445	0.005217803371020453
iso-hsa-miR-151a- 3p_TACTAGACTAAAGCTCCTTGAGGT	8.845594649607445	0.005217803371020453
iso-hsa-miR-92a- 3p_GATTGCACTTGTCCCGGCCTGAA	8.845594649607445	0.005217803371020453
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTATGTTGTGTGG	8.816195372750641	0.005285512415951764
iso-hsa-miR-589- 5p_TGAGAACCACGTCCGCTCTGAGC	8.696842105263158	0.0055702068262932485

iso-hsa-miR-652- 3p_GATGGCGCCACTAGGGTTGTGA	8.418140050047175	0.0063009456943287695
iso-hsa-miR-1307- 3p_ACTCGGCGTAGCGTCGGTCGTGT	8.418140050047175	0.0063009456943287695
iso-hsa-miR-382- 5p_GAAGTTGTTTCGCGGTGGATTC	8.289473684210527	0.006672365487531239
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAAGTTGTGTGGTAT	8.289473684210527	0.006672365487531239
iso-hsa-let-7i- 5p_TGAGTTAGTAGTTTGTGCTGTTTT	8.289473684210527	0.006672365487531239

Zoradenie miRNA uvedené v tabuľke 1 je podľa koeficientu ich významnosti, ktorý určuje, nakoľko je dôležité sa danou molekulou pri analýze zaoberať (akú významnú úlohu má na predikcii výsledku).

**Tabuľka 2** Treshold AUC ROC (Receiver operating characteristic of Logistic Regression), senzitivita a špecificita miRNA biomarkerov predikujúcich úspešnosť/neúspešnosť IVF procesu v plazme žien

<b>Treshold, Cut off hodnoty pre miRNA biomarkery predikcie úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu</b>	<b>Threshold</b>	<b>Senzitivita %</b>	<b>Špecificita %</b>	<b>AUC</b>	<b>CoffNC</b>
iso-hsa-miR-126- 3p_CGTACCGTGAGAAATAATGCGT	0,7	81	35	0.75	1
iso-hsa-let-7i- 5p_TGTGGTAGTAGTTTGTGCTGTA	0.608	1	64	0.68	1
iso-hsa-miR-342- 3p_TCTCACACAGAAATCGGACCCGTCT	0.768	52	58	0.74	1
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTTA	0.651	91	47	0.65	1

iso-hsa-miR-132- 3p_TAACAGCCTACAGCCATGGTCGT	0.81	38	0	0.69	1
iso-hsa-miR-23b- 3p_GCACATTGCCAGGGATTACCACT	0.61	100	65	0.68	1
iso-hsa-miR-125a- 5p_TCCCTGAGACCTTTTAACCTGT	0.75	48	58	0,71	1
iso-hsa-miR-584- 5p_TATGGTTTGCCTGGGACTG	0.62	100	65	0.68	1
iso-hsa-miR-127- 3p_TCGGATCAGTCTGAGCTTGGCTTTT	0.61	100	65	0.68	1
iso-hsa-miR-101- 3p_TACTACTGTGATAACTGA	0.621	95	59	0.68	1
iso-hsa-miR-151a- 3p_TACTAGACTAAAGCTCCTTGAGGT	0.62	95	59	0.68	1
iso-hsa-miR-92a- 3p_GATTGCACTTGTCCCGCCTGAA	0.62	95	59	0.69	1
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTATGTTGTGTGG	0.67	67	12	0.78	5
iso-hsa-miR-589- 5p_TGAGAACCACGTCCGCTCTGAGC	0.80	38	0	0.69	1
iso-hsa-miR-652- 3p_GATGGCGCCACTAGGGTTGTGA	0.62	95	59	0.68	1
iso-hsa-miR-1307- 3p_ACTCGGCGTAGCGTCGGTCGTGT	0.63	95	58	0.68	1
iso-hsa-miR-382- 5p_GAAGTTGTTTCGCGGTGGATTC	0.59	100	71	0.65	1
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAAGTTGTGTGGTAT	0.60	100	71	0.72	1
iso-hsa-let-7i- 5p_TGAGTTAGTAGTTTGTGCTGTTTT	0.60	100	70	0.65	1

Cut off hodnota normalizovaných čítaní (CoffNC), CoffNC ABS (TPR-(1-FPR), Hodnota  $\geq$  CoffNC =IVF úspešné; Hodnota  $<$  CoffNC =IVF neúspešné

Pri každej z vybraných miRNA molekúl je potrebný minimálny počet sekvenačných čítaní uvedených v poslednom stĺpci tabuľky 2 (cut off hodnota normalizovaných čítaní = 1 alebo 5). Ak pri molekule miRNA je určená hraničná hodnota 1, tak všetky hodnoty  $\geq 1$  predikujú úspešný IVF proces a cut off hodnoty miRNA molekúl s hodnotou  $< 1$  predikujú neúspešný IVF proces. Molekula iso-hsa-let-7b-5p má určenú cut off hodnotu normalizovaných čítaní 5, čo znamená, že akákoľvek hodnota  $\geq 5$  predikuje úspešný IVF proces a  $< 5$  neúspešný IVF proces.

Na 100 % predikciu úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu je potrebná analýza každej z vybraných 19 biomarkerových miRNA molekúl (Tab. 2). Na analýzu úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu je možné použiť aj menší počet miRNA molekúl, avšak úspešnosť predikcie výsledku bude nižšia.

Success test je možné využiť ako bezpečný, neinvazívny diagnostický test úspešnosti IVF procesu. Z testu je možné vytvoriť komerčný produkt (službu) určený pre verejnosť.

Uvedené kanonické a iso-miRNA molekuly s uvedenými sekvenciami je možné využiť aj v inej forme diagnostických testov, ako konkrétne próby pre určenie úspešnosti IVF procesu.

V tabuľke 3 je uvedený zoznam konkrétnych kanonických a iso-miRNA molekúl detegovaných z kultivačného média embryí CultMed testom. Molekuly identifikované v kultivačnom médiu embrya sú zoradené podľa dôležitosti, resp. významnosti na základe ich koeficientu významnosti, ktorý určuje, nakoľko je významné sa danou molekulou pri analýze zaoberať (akú významnú úlohu má na predikcii výsledku).

### Tabuľka 3

Predikčné biomarkery selekcie kompetentného embrya/nekompetentného embrya v IVF procese

<b>Predikčné biomarkery selekcie kompetentného</b>	<b>coef</b> (koeficient	<b>p</b> (p-value, H0: rozloženie
--	----------------------------	--------------------------------------

<b>embrya/ nekompetentného embrya v IVF procese</b>	dôležitosti, významnosti)	dát vzhľadom na výsledok IVF je rovnaké)
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTGGTAGGTTGTGTGGT	9.621526827042178	0.003391088823611076
iso-hsa-miR-423- 5p_TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTA	9.529546351084809	0.003532537765767483
iso-hsa-miR-21- 5p_TAGCTTACCAGACTGATGTTGAC	9.37945619335347	0.003776937060541304
iso-hsa-miR-486- 5p_TCCTGTAAGTACTGAGCTGCCAGAGA	8.899093803575798	0.004687231604519787
iso-hsa-miR-486- 5p_TCCTGTAAGTACTGAGCTGCCTCGAG	7.886037735849056	0.007462265245605795
iso-hsa-miR-25- 3p_CATTGCAATTGTCTCGGTCTGA	7.166666666666666	0.010471649328310581
iso-hsa-miR-3613- 5p_TGTTGTAAGTTTTTTTTTTTGT	6.723975915506861	0.01294940775142319
iso-hsa-miR-142- 3p_TGTAAGTGTTCCTACCTTATGGA	6.254545454545453	0.0162767044425456
iso-hsa-miR-664a- 5p_ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA	6.254545454545453	0.0162767044425456
iso-hsa-miR-151a- 3p_CAAGACTGAAGCTCCTTGAGG	5.757024793388432	0.020828127625493652
iso-hsa-miR-92a- 3p_TATCGCACTTGTCCCGGCCTGT	5.752285490865144	0.020877563509075946
iso-hsa-let-7a- 5p_TGATGTAGTAGGTTGTATAG	5.676567656765675	0.021684740586716857
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTA	5.618093452752898	0.022331072190788642
iso-hsa-miR-100- 5p_AACCCGTAGATCCGAAGTTGT	5.448383233532933	0.024327313909886367

iso-hsa-miR-191- 5p_CAATGGAATCCCAAAGCAGCTG	5.3960784313725485	0.024980707010107902
iso-hsa-let-7a- 5p_TGAGTTAGTAGGTTGTATAG	5.3960784313725485	0.024980707010107902
iso-hsa-let-7d 5p_AGAGGTAGTAGGTTGCGTAGTT	5.3960784313725485	0.024980707010107902

Na základe metód strojového učenia bolo vyselektovaných 17 predikčných biomarkerov, ktoré boli klasifikované ako významné predikčné biomarkery na určenie kompetencie embrya v IVF procese.

**Tabuľka 4** Treshold AUC ROC, senzitivita a špecificita miRNA biomarkerov predikujúcich vysokokvalitné embryo a nízkokvalitné embryo

<b>Treshold, Cut off hodnoty miRNA biomarkery predikcie úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu</b>	<b>Threshold</b>	<b>Senzitivita %</b>	<b>Špecificita %</b>	<b>AUC</b>	<b>CoffNC</b>
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTGGTAGGTTGTGTGGT	0.5	92	47	70	1
iso-hsa-miR-423- 5p_TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTA	0.5	92	43	68	1
iso-hsa-miR-21- 5p_TAGCTTACCAGACTGATGTTGAC	0.4	96	38	67	1
iso-hsa-miR-486- 5p_TCCTGTACTIONGAGCTGCCAGAGA	0.4	96	38	67	1
iso-hsa-miR-486- 5p_TCCTGTACTIONGAGCTGCCTCGAG	0.4	96	38	67	1
iso-hsa-miR-25- 3p_CATTGCAATTGTCTCGGTCTGA	0.3	100	24	62	1

iso-hsa-miR-3613- 5p_TGTTGTA CTTTTTTTTTTGTT	0,6	96	29	63	1
iso-hsa-miR-142- 3p_TGTAGTGTTTCCTACCTTATGGA	0.3	100	24	62	1
iso-hsa-miR-664a- 5p_ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA	0.3	100	24	62	1
iso-hsa-miR-151a- 3p_CAAGACTGAAGCTCCTTGAGG	0.5	50	81	68	1
iso-hsa-miR-92a- 3p_TATCGCACTTGTCCCGCCTGT	0,5	96	29	63	1
iso-hsa-let-7a- 5p_TGATGTAGTAGGTTGTATAG	0.3	100	24	62	1
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTA	0.6	33	95	65	1
iso-hsa-miR-100- 5p_AACCCGTAGATCCGAACTTGT	0.6	30	95	63	1
iso-hsa-miR-191- 5p_CAATGGAATCCCAAAGCAGCTG	0.3	100	19	60	1
iso-hsa-let-7a- 5p_TGAGTTAGTAGGTTGTATAG	0.3	100	19	60	1
iso-hsa-let-7d 5p_AGAGGTAGTAGGTTGCGTAGTT	0.3	100	19	60	1

Cut off normalizovaných čítaní (CoffNC); CoffNC ABS (TPR-(1-FPR); Hodnota  $\geq$  CoffNC = vysokokvalitné embryo; Hodnota  $<$  CoffNC = nízkokvalitné embryo

V poslednom stĺpci tabuľky 4 je určená hodnota cut off normalizovaných čítaní. Ak pri molekule miRNA je určená hraničná hodnota 1, tak všetky hodnoty  $\geq$  1 predikujú kvalitné vysokokompetentné embryo a cut off hodnoty miRNA molekúl s hodnotou  $<$  1 predikujú nekvalitné nízkokompetentné embryo. Na základe týchto hodnôt sa dá selektovať vysokokvalitné embryo vhodné na transfer v IVF procese.



Na analýzu predikcie vysokokompetentného/nízkokompetentného embrya so 100 % senzitivitou a 80 % špecificitou je potrebná analýza všetkých vybraných 17 miRNA biomarkerov. Na analýzu vysokokompetentného/nízkokompetentného embrya je možné použiť aj menší počet miRNA molekúl, avšak úspešnosť predikcie výsledku bude nižšia.

CultMed test sa dá využiť ako bezpečný, neinvazívny diagnostický test selekcie vysokokompetentného embrya. Z testu je možné vytvoriť diagnostický produkt (službu), avšak je možné ho využiť aj na selekciu embrya najvhodnejšieho na IVF transfer (komplementárny test k Success testu).

Uvedené kanonické a iso-miRNA molekuly s uvedenými sekvenciami je možné využiť aj v inej forme diagnostických testov, ako konkrétne próby pre selekciu embrya najvhodnejšieho na IVF transfer.

Testy sú nezávislé a je vhodné ich kombinovať, čo zvýši úspešnosť IVF procesu vďaka optimalizácii predikcie termínu IVF u pacientky a zefektívneniu výberu embrya. Dané diagnostické testy je možné ponúknuť neplodným párom formou služby - diagnostika kompetencie matky (výber najvhodnejšieho dňa IVF transferu), selekcia embrya.

### **Prehľad obrázkov na výkresoch**

Obr. 1 – Výsledná ROC krivka analýzy 19 miRNA biomarkerov z plazmy ženy

Obr. 2 – Výsledná ROC krivka analýzy 10 miRNA biomarkerov z plazmy ženy

Obr. 3 – Výsledná ROC krivka analýzy 17 miRNA biomarkerov z kultivačného média embrya

Obr. 4 – Výsledná ROC krivka analýzy 14 miRNA biomarkerov z kultivačného média embrya

### **Príklady uskutočnenia vynálezu**

### Príklad 1

V príklade 1 je zaznamenaná uskutočnená detekcia konkrétnych kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl izolovaných z plazmy periférnej krvi 37-ich žien vo veku do 37 rokov metódou NGS sekvenovania. V deň transferu embrya bola ženám odobraná periférna krv, ktorá slúžila na analýzu nekódujúcich RNA molekúl z plazmy. Analyzovaných bolo 19 vybraných kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl (Tab. 2).

Vyhodnotenie:

V testovaných plazmách dosahovali cut off hodnoty miRNA biomarkerov úroveň  $\geq 1$ .

V prípade biomarkera iso-hsa-let-7b-5p bola cut off hodnota  $\geq 5$ .

Zvyšné cut off hodnoty dosahovali hodnoty  $< 1$ .

Úspešný IVF proces bol zaznamenaný u 20 žien a neúspešný IVF proces bol zaznamenaný u 17-tich žien.

ROC analýza (Receiver Operating Characteristic curve) ukázala, že kombinácia 19 kanonických miRNA molekúl izolovaných z plazmy žien v deň transferu embrya (vid'. Tab. 2) predikuje úspešnosť/neúspešnosť IVF procesu so 100 % senzitivitou a 100 % špecificitou (Area Under the ROC curve, AUC = 1,0, [1-1]; p0.001), ako je zobrazené na obrázku 1.

### Príklad 2

V príklade 2 je zaznamenaná uskutočnená detekcia konkrétnych kanonických miRNA a iso-miRNA molekúl detegovaných v plazme 37-ich žien vo veku do 37 rokov NGS sekvenovaním. V deň transferu embrya bola ženám odobraná periférna krv, ktorá slúžila na analýzu nekódujúcich RNA molekúl z plazmy. Na analýzu bol použitý menší počet kanonických miRNA. Vybraných bolo 10 kanonických miRNA a iso-miRNA, ktoré sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

<b>miRNA biomarkery predikcie úspešnosti/neúspešnosti IVF procesu</b>
iso-hsa-miR-126- 3p_CGTACCGTGAGAAATAATGCGT
iso hsa-let-7i-5p_TGTGGTAGTAGTTTGTGCTGTA

iso-hsa-miR-342- 3p_TCTCACACAGAAATCGGACCCGTCT
iso-hsa-let-7b- 5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTTA
iso-hsa-miR-132- 3p_TAACAGCCTACAGCCATGGTCGT
iso-hsa-miR-23b- 3p_GCACATTGCCAGGGATTACCACT
iso-hsa-miR-125a- 5p_TCCCTGAGACCTTTTAACCTGT
iso-hsa-miR-584-5p_TATGGTTTGCCTGGGACTG
iso-hsa-miR-127- 3p_TCGGATCAGTCTGAGCTTGGCTTTT
iso-hsa-miR-151a- 3p_TACTAGACTAAAGCTCCTTGAGGT

Vyhodnotenie:

Pri zmene počtu významných biomarkerov bola použitá metóda permutácie testovacích a overovacích vzoriek v počte 7 opakovaní v pomere 20/80 percent. Analýza pomocou ROC uvedenej metódy ukázala, že kombinácia kanonických 10 miRNA molekúl analyzovaných z plazmy žien v deň transferu embrya (Obr. 2) predikuje úspešnosť/neúspešnosť IVF procesu. Priemerná hodnota presnosti predikcie meraná pomocou výpočtu AUC je na úrovni 0,97 (resp. 97 %), pri rozptyle +/- 0,06 (Obr. 2). Pri analýze 10 kanonických miRNA (z plazmy) je presnosť predikcie výsledku testu na úrovni 97 %.

### Príklad 3

V príklade 3 je zaznamenaná detekcia konkrétnych kanonických a iso-hsa-miRNA molekúl izolovaných zo 45 kultivačných médií embryí. Štandardne bolo kultivačné médium odoberané v piaty deň kultivácie embrya. Embryo vylučovalo do kultivačnej tekutiny nekódujúce RNA molekuly, ktoré slúžia k diferenciálnej selekcii vysokokvalitného embrya. V kultivačnom médiu embrya bolo z množstva

detegovaných molekúl vybraných 17 iso-hsa-miRNA molekúl, ktoré boli sekvenované metódou NGS (Tab. 4). Pomocou metód strojového učenia bol určený počet miRNA biomarkerov predikujúcich vysokokvalitné/nízkokvalitné embryo.

Vyhodnotenie:

Cut off hodnoty kultivačných médií vysokokompetentných embryí dosahovali pre všetky testované miRNA biomarkery hodnoty  $\geq 1$ .

Cut off hodnoty kultivačných médií nízkokompetentných embryí dosahovali pre všetky testované miRNA biomarkery hodnoty  $< 1$ .

Na základe výsledkov boli kultivačné médiá embryí rozdelené do dvoch skupín: 25 kultivačných médií vykazovalo vysokokompetentné - kvalitné embryo, 20 kultivačných médií vykazovalo nízkokompetentné - nekvalitné embryo.

ROC analýza ukázala, že 17 kanonických a iso-miRNA molekúl (tabuľka 4) odliši, predikuje, diferencuje vysokokompetentné embryo od nízkokompetentného (neúspešného) embrya v IVF procese so 100 % senzitivitou a 80 % špecificitou (AUC = 0,9 [0.8-1.0]; p0.001) ROC zobrazuje obrázok 3.

#### Príklad 4

Postupovalo sa rovnako ako v príklade 3, avšak na analýzu vysokokompetentného /nízkokompetentného embrya bolo vybraných 14 kanonických a iso-miRNA izolovaných z kultivačných médií embryí, ktoré sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

<b>Predikčné biomarkery selekcie kompetentného /nekompetentného embrya v IVF procese</b>
iso-hsa-let-7b-5p_TGAGGTGGTAGGTTGTGTGGT
iso-hsa-miR-423-5p_TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTA
iso-hsa-miR-21-5p_TAGCTTACCAGACTGATGTTGAC
iso-hsa-miR-486-5p_TCCTGTACTIONGAGCTGCCAGAGA
iso-hsa-miR-486-5p_TCCTGTACTIONGAGCTGCCTCGAG

iso-hsa-miR-25-3p_CATTGCAATTGTCTCGGTCTGA
iso-hsa-miR-3613-5p_TGTTGTA CTTTTTTTTTTGTT
iso-hsa-miR-142-3p_TGTAGTGTTCCTACCTTATGGA
iso-hsa-miR-664a- 5p_ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA
iso-hsa-miR-151a-3p_CAAGACTGAAGCTCCTTGAGG
iso-hsa-miR-92a-3p_TATCGCACTTGTCCCGCCTGT
iso-hsa-let-7a-5p_TGATGTAGTAGGTTGTATAG
iso-hsa-let-7b-5p_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTA
iso-hsa-miR-100-5p_AACCCGTAGATCCGAACTTGT

Vyhodnotenie:

Rovnako ako v príklade 2 bola použitá metóda permutácie testovacích a overovacích vzoriek v počte 7 opakovaní v pomere 20/80 percent. Analýza pomocou ROC uvedenej metódy ukázala, že kanonické a iso-miRNA molekuly zobrazené na obrázku 4 odlišujú, predikujú vysokokompetentné embryo od nízkokompetentného (neúspešného) embrya v IVF procese pri nižšom počte predikčných miRNA (14) biomarkerov. Priemerná hodnota presnosti predikcie meraná pomocou výpočtu AUC je na úrovni 0,97 (resp. 97 %), pri rozptyle +/- 0,06 (Obr. 4.). Analýzou 14 kanonických a iso-miRNA z kultivačného média embrya je presnosť predikcie výsledku testu na úrovni 97 %.

## Zoznam literatúry

- de Mouzon, Hazout, Cohen-Bacrie, Belloc, Cohen-Bacrie, Blood type and ovarian reserve, *Human Reproduction*, 27, (5), 2012,1544–1545.
- Kosteria , Anagnostopoulos , Kanaka-Gantenbein , Chrousos , The Use of Proteomics in Assisted Reproduction, *In Vivo*, 31(3), 2017, 267-283.
- Asirvatham, Magner, miRNA regulation of cytokine genes, *Cytokine*, 45, (2), 2009, 58-69.
- McCallie , Schoolcraft , Katz-Jaffe MG, Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility, *Fertil Steril*, 93(7), 2010, 2374-82.
- Mouillet, Ouyang, Coyne, MicroRNAs in placental health and disease, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213, 2015, 163–S172.
- Catalanotto, Cogoni, Zardo, MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2016.
- Rosenbluth, Shelton, Sparks, Devor, Christenson, Van Voorhis, MicroRNA expression in the human blastocyst, *Fertil Steril.*, 1, 99(3), 2013, 855-861.
- Lee, Finniss, Cazacu, Xiang, Brodie, Mesenchymal stem cells deliver exogenous miRNAs to neural cells and induce their differentiation and glutamate transporter expression, *Stem Cells Dev.*, 1,(23), 2014 Dec 2851-61.
- Chang, Wakeland, Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *Journal of Endocrinology* 236, 2018,43–R56.
- Tang, Kaneda, O'Carroll, Hajkova, Barton, Sun, Lee, Tarakhovsky, Lao, Surani, Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development, *Genes Dev.*, 21(6), 2007, 644-8.
- Zhang, Dunk, Croy To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. *Cell and Tissue Research*, 363, 2016 249–265.
- Bonilla-Musoles, Raga, Osborne, Castillo, Bonilla, Endometrial receptivity: evaluation with ultrasound, *Ultrasound Q.*, 29(1), 2013, 3-20.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob hodnotenia úspešnosti *in vitro* fertilizačného procesu, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa dve nezávislé analýzy:

- identifikácia a analýza vybraných prognostických kanonických miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov z plazmy periférnej krvi žien v deň *in vitro* fertilizačného procesu;

kde úspešná evaluácia vykazuje cut off hodnoty  $\geq 1$  pri počte čítaní 1 alebo cut off hodnoty  $\geq 5$  pri počte čítaní 5;

- identifikácia a analýza vybraných prognostických kanonických miRNA a/alebo iso-miRNA z kultivačného média embrya odobraného na 4. až 6. deň kultivácie embrya s 95 % presnosťou predikcie stanovenou AUC metódou zahŕňa nasledujúce kroky:

- i. odber vzorky kultivačného média embrya;
- ii. izoláciu všetkých miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov, následne sekvenačnú analýzu a analýzu dát vybraných 14 miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov, ktoré sú zoradené podľa závislosti ich významu pre výsledok *in vitro* fertilizačného procesu:

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 20, TGAGGTGGTAGGTTGTGTGGT

iso-hsa-miR-423-5p v SEQ ID NO: 21, TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTA

iso-hsa-miR-21-5p v SEQ ID NO: 22, TAGCTTACCAGACTGATGTTGAC

iso-hsa-miR-486-5p v SEQ ID NO: 23, TCCTGTAAGTACTGAGCTGCCAGAGA

iso-hsa-miR-486-5p v SEQ ID NO: 24, TCCTGTAAGTACTGAGCTGCCTCGAG

iso-hsa-miR-25-3p v SEQ ID NO: 25, CATTGCAATTGTCTCGGTCTGA

iso-hsa-miR-3613-5p v SEQ ID NO: 26, TGTTGTAAGTTTTTTTTTTTGT

iso-hsa-miR-142-3p v SEQ ID NO: 27, TGTAAGTGTTCCTACCTTATGGA

iso-hsa-miR-664a-5p v SEQ ID NO: 28, ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA

iso-hsa-miR-151a-3p v SEQ ID NO: 29, CAAGACTGAAGCTCCTTGAGG

iso-hsa-miR-92a-3p v SEQ ID NO: 30, TATCGCACTTGTCCCGGCCTGT

iso-hsa-let-7a-5p v SEQ ID NO: 31, TGATGTAGTAGGTTGTATAG

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 32, TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTA

iso-hsa-miR-100-5p v SEQ ID NO: 33, AACCCGTAGATCCGAAGTTGT

iii. určenie hodnoty počtu čítaní 14 miRNA biomarkerov z kroku ii);  
kde úspešná evaluácia vykazuje cut off hodnoty  $\geq 1$  pri počte čítaní 1;

a

kde ak je evaluácia oboch analýz úspešná, potom aj predikcia *in vitro* fertilizačného procesu je úspešná.

**2.** Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že evaluácia identifikácie vybraných prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov z plazmy periférnej krvi žien v deň *in vitro* fertilizačného procesu s 97 % presnosťou predikcie stanovenou metódou AUC zahŕňa nasledujúce kroky:

a) odber vzorky plazmy periférnej krvi, ktorá bola získaná od ženy;

b) Izoláciu všetkých miRNA, následne sekvenačnú analýzu a analýzu dát vybraných 10 miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov, ktoré sú zoradené podľa závislosti ich významu pre výsledok *in vitro* fertilizačného procesu:

iso-hsa-miR-126-3p v SEQ ID NO: 1, CGTACCGTGAGAAATAATGCGT

iso-hsa-let-7i-5p v SEQ ID NO: 2, TGTGGTAGTAGTTTGTGCTGTA

iso-hsa-miR-342-3p v SEQ ID NO: 3, TCTCACACAGAAATCGGACCCGTCT

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 4, TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTTA

iso-hsa-miR-132-3p v SEQ ID NO: 5, TAACAGCCTACAGCCATGGTCGT

iso-hsa-miR-23b-3p v SEQ ID NO: 6, GCACATTGCCAGGGATTACCACT

iso-hsa-miR-125a-5p v SEQ ID NO: 7, TCCCTGAGACCTTTTAACCTGT

iso-hsa-miR-584-5p v SEQ ID NO: 8, TATGGTTTGCCTGGGACTG

iso-hsa-miR-127-3p v SEQ ID NO: 9, TCGGATCAGTCTGAGCTTGGCTTTT

iso-hsa-miR-151a-3p v SEQ ID NO:11, TACTAGACTAAAGCTCCTTGAGGT

c) určenie hodnoty počtu čítaní 10 miRNA biomarkerov z kroku b).

**3.** Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že evaluácia identifikácie vybraných prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov z plazmy periférnej krvi žien v deň *in vitro* fertilizačného procesu so 100 % senzitivitou a 100 % špecificitou zahŕňa nasledujúce kroky:

a) odber vzorky plazmy periférnej krvi, ktorá bola získaná od ženy;



b) izoláciu všetkých miRNA, následne sekvenačnú analýzu a analýzu dát vybraných 19 miRNA, ktoré sú zoradené podľa závislosti ich významu pre výsledok *in vitro* fertilizačného procesu:

iso-hsa-miR-126-3p v SEQ ID NO: 1, CGTACCGTGAGAAATAATGCGT

iso-hsa-let-7i-5p v SEQ ID NO: 2, TGTGGTAGTAGTTTGTGCTGTA

iso-hsa-miR-342-3p v SEQ ID NO: 3, TCTCACACAGAAATCGGACCCGTCT

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 4, TGAGGTAGTAGTTGTGTGTTA

iso-hsa-miR-132-3p v SEQ ID NO: 5, TAACAGCCTACAGCCATGGTCGT

iso-hsa-miR-23b-3p v SEQ ID NO: 6, GCACATTGCCAGGGATTACCACT

iso-hsa-miR-125a-5p v SEQ ID NO: 7, TCCCTGAGACCTTTTAACTGT

iso-hsa-miR-584-5p v SEQ ID NO: 8, TATGGTTTGCCTGGGACTG

iso-hsa-miR-127-3p v SEQ ID NO: 9, TCGGATCAGTCTGAGCTTGGCTTTT

iso-hsa-miR-101-3p v SEQ ID NO: 10, TACTACTGTGATAACTGA

iso-hsa-miR-151a-3p v SEQ ID NO: 11, TACTAGACTAAAGCTCCTTGAGGT

iso-hsa-miR-92a-3p v SEQ ID NO: 12, GATTGCACTTGTCCCGGCCTGAA

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 13, TGAGGTAGTATGTTGTGTGG

iso-hsa-miR-589-5p v SEQ ID NO: 14, TGAGAACCACGTCCGCTCTGAGC

iso-hsa-miR-652-3p v SEQ ID NO: 15, GATGGCGCCACTAGGGTTGTGA

iso-hsa-miR-1307-3p v SEQ ID NO: 16, ACTCGGCGTAGCGTCGGTCGTGT

iso-hsa-miR-382-5p v SEQ ID NO: 17, GAAGTTGTTTCGCGGTGGATTC

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 18, TGAGGTAGTAAGTTGTGTGGTAT

iso-hsa-let-7i-5p v SEQ ID NO: 19, TGAGTTAGTAGTTTGTGCTGTTTT

c) Určenie hodnoty počtu čítaní všetkých 19 miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov z kroku b).

**4.** Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že evaluácia identifikácie vybraných prognostických kanonických miRNA a iso-miRNA biomarkerov z kultivačného média embrya so 100 % senzitivitou a 80 % špecificitou zahŕňa nasledujúce kroky:

- i. odber vzorky kultivačného média embrya;
- ii. izolácia všetkých miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov, následne sekvenačná analýza a analýza dát vybraných 17 miRNA a/alebo iso-miRNA, ktoré sú

zoraďené podľa závislosti ich významu pre výsledok *in vitro* fertilizačného procesu:

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 20, TGAGGTGGTAGGTTGTGTGGT

iso-hsa-miR-423-5p v SEQ ID NO: 21, TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTA

iso-hsa-miR-21-5p v SEQ ID NO: 22, TAGCTTACCAGACTGATGTTGAC

iso-hsa-miR-486-5p v SEQ ID NO: 23, TCCTGTACTIONGAGCTGCCAGAGA

iso-hsa-miR-486-5p v SEQ ID NO: 24, TCCTGTACTIONGAGCTGCCTCGAG

iso-hsa-miR-25-3p v SEQ ID NO: 25, CATTGCAATTGTCTCGGTCTGA

iso-hsa-miR-3613-5p v SEQ ID NO: 26, TGTTGTACTIONTTTTTTTTTTGTT

iso-hsa-miR-142-3p v SEQ ID NO: 27, TGTAGTGTTTCCTACCTTATGGA

iso-hsa-miR-664a-5p v SEQ ID NO: 28, ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA

iso-hsa-miR-151a-3p v SEQ ID NO: 29, CAAGACTGAAGCTCCTTGAGG

iso-hsa-miR-92a-3p v SEQ ID NO: 30, TATCGCACTTGTCCCGGCCTGT

iso-hsa-let-7a-5p v SEQ ID NO: 31, TGATGTAGTAGGTTGTATAG

iso-hsa-let-7b-5p v SEQ ID NO: 32, TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTA

iso-hsa-miR-100-5p v SEQ ID NO: 33, AACCCGTAGATCCGAACCTTGT

iso-hsa-miR-191-5p v SEQ ID NO: 34, CAATGGAATCCCAAAAGCAGCTG

iso-hsa-let-7a-5p v SEQ ID NO: 35, TGAGTTAGTAGGTTGTATAG

iso-hsa-let-7d 5p v SEQ ID NO: 36 AGAGGTAGTAGGTTGCGTAGTT

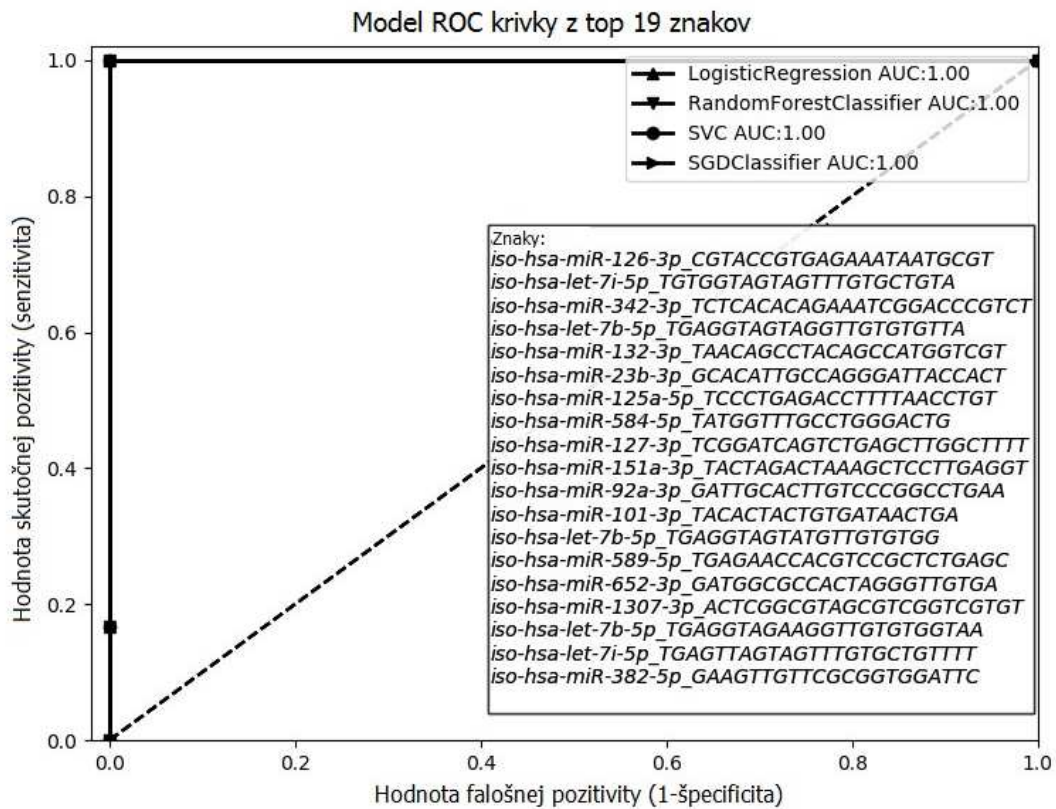
- iii. určenie hodnoty počtu čítaní všetkých 17 miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov z kroku ii).

**5.** Spôsob podľa nároku 2 alebo 3, vyznačujúci sa tým, že cut off (hraničná) hodnota 1 vybraných prognostických kanonických miRNA a/alebo iso-miRNA biomarkerov z plazmy periférnej krvi žien v deň *in vitro* fertilizačného procesu určuje miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 1$ , ktoré predikujú úspešný IVF proces a s hodnotou  $< 1$ , ktoré predikujú neúspešný IVF proces, a cut off (hraničná) hodnota 5, ktorá rozdeľuje miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 5$ , ktoré predikujú úspešný *in vitro* fertilizačný proces a hodnoty  $< 5$  predikujúce neúspešný *in vitro* fertilizačný proces.

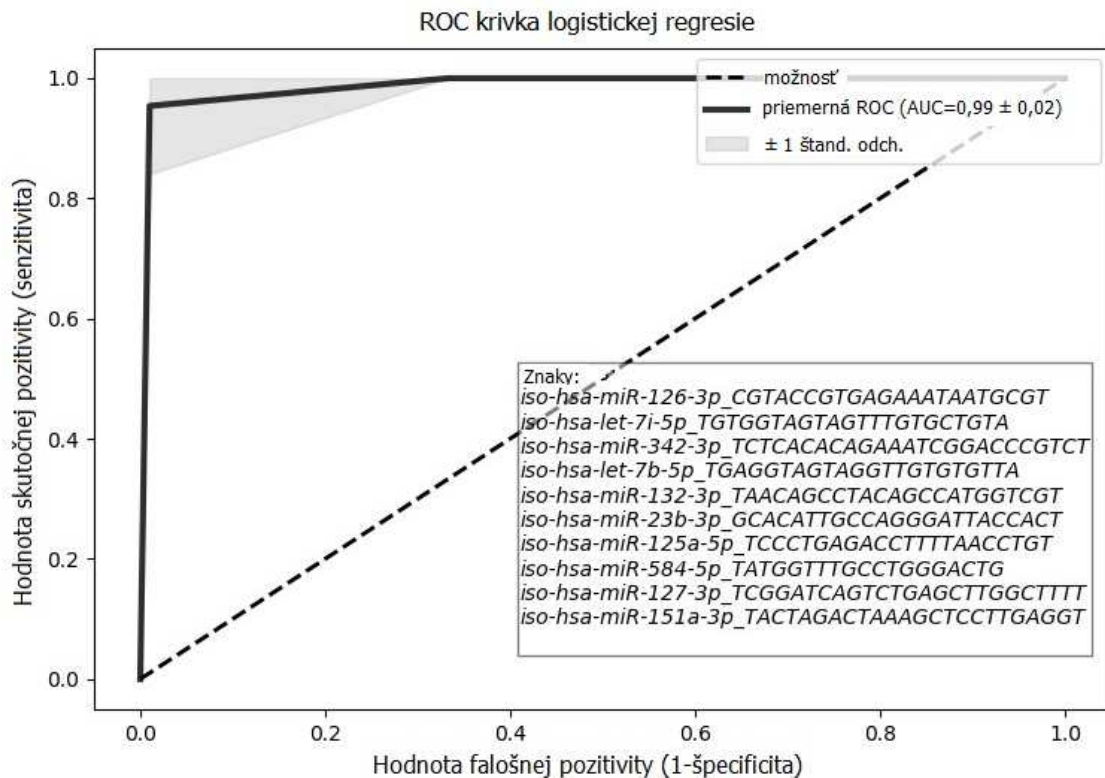
**6.** Spôsob podľa nároku 1 alebo 4, vyznačujúci sa tým, že cut off (hraničná) hodnota 1 vybraných prognostických kanonických miRNA a/alebo iso-miRNA

z kultivačného média embrya odobraného na 4. až 6. deň kultivácie embrya určuje miRNA molekuly s hodnotou  $\geq 1$ , ktoré predikujú vysokokompetentné (kvalitné) embryo, a teda úspešný *in vitro* fertilizačný proces a hodnoty  $< 1$  predikujú nízkokompetentné (nekvalitné) embryo a teda neúspešný *in vitro* fertilizačný proces.

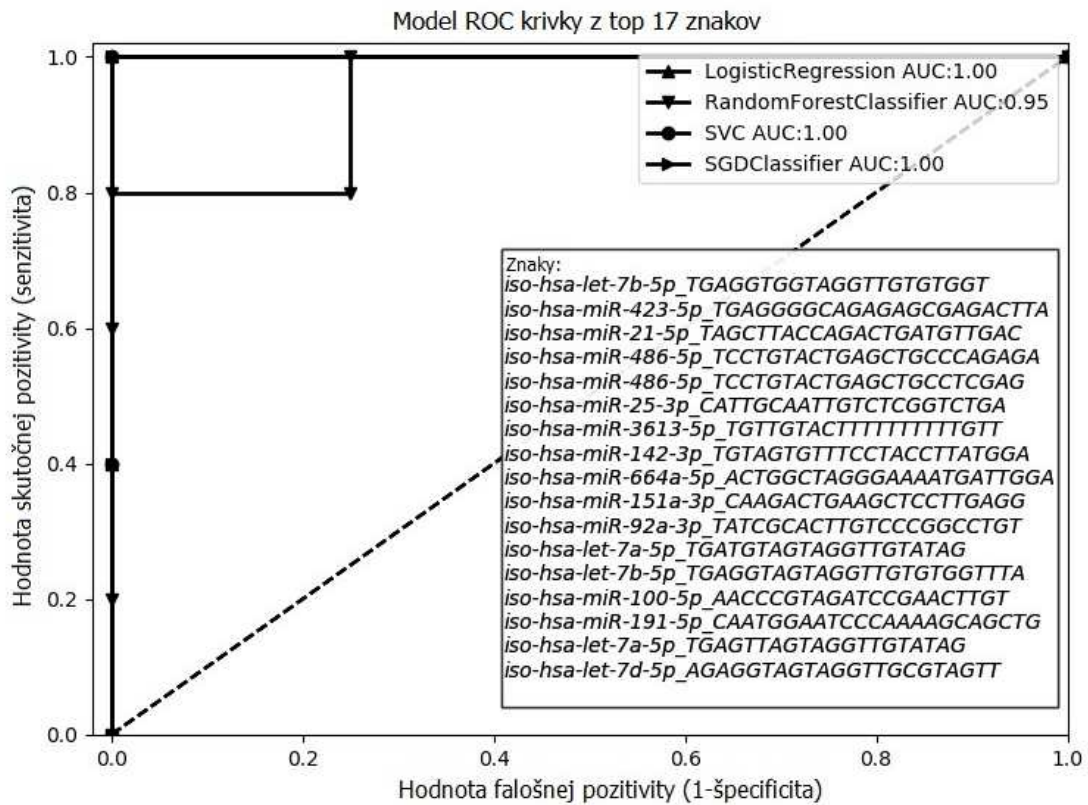
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

