

# Human in-vitro gamete interaction analysed by DNA-fluorescence

Citation for published version (APA):

van Wissen, A.-MB. (1996). *Human in-vitro gamete interaction analysed by DNA-fluorescence*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19960209aw>

## Document status and date:

Published: 01/01/1996

## DOI:

[10.26481/dis.19960209aw](https://doi.org/10.26481/dis.19960209aw)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

Fertilization after assisted reproductive technologies such as in vitro fertilization (IVF), subzonal insemination (SUZI) and intracytoplasmic insemination (ICSI) is rarely 100% successful. Therefore, in this study we focus on fertilization failure and abnormal embryo development after IVF. Unfertilized oocytes, delayed zygotes, zygotes which interrupted their development and embryos which were unsuitable for transfer, were generally obtained 48 h after in-vitro insemination. The intra- and extracellular DNA-containing structures (cell-nuclei and spermatozoa adherent to the zona pellucida) were studied in-vitro, after incubation with the DNA fluorescent dye Hoechst 33342. Some of the oocytes (n=26) observed by fluorescence microscopy were subsequently fixed and sectioned for classical light microscopy to allow parallel observations.

In Chapter II, the following observations were discussed: sperm penetration in both mature and immature oocytes, decondensation of spermheads, premature condensation of male chromatin, polyspermy, pronucleus formation and ageing processes of the oocyte such as the centripetal migration of the metaphase II chromosomes, the formation of a restitution nucleus and the lagging of chromosomes within the metaphase spindle. The clinical use of these findings was demonstrated in Chapter III. Four main causes contributed to the low fertilization and cleavage rate (0 to 20%) for 10 patients: (1) sperm incapacity, (2) oocyte immaturity, (3) delayed fertilization, and (4) oocyte abnormalities revealed by aberrations in the morphology of female chromatin. The number of spermatozoa tightly bound to or partly penetrated into the zona pellucida was positively related to the presence of sperm chromatin inside the ooplasm but without pronucleus formation. Furthermore, both were positively related to the incidence of fertilization of cohort oocytes. In some cases, sperm-zona binding and sperm penetration were dissociated, sperm-zona binding was successful but not penetration, and vice versa. This dissociation may be due to particular sperm or zona pellucida defects (Chapter IV).

Out of 440 unfertilized oocytes or zygotes analysed, the majority of oocytes was at metaphase II (63.4%), 14.8% were immature (at germinal vesicle or metaphase I stage), 7.0% were activated, 6.8% had pronuclei and 8.0% had an aberrant morphology of female chromatin or could not be analysed. Sperm penetration without pronucleus formation was frequently found in immature, mature and activated oocytes (23.6%). A subpopulation of functionally unfit oocytes was present when most cohort oocytes had cleaved; sperm chromatin was found inside the ooplasm without pronucleus formation. When none or few cohort oocytes had cleaved (with or without male infertility) and when infertility was of male origin, sperm penetration incapacity was demonstrated by the presence of post-meiotically aged oocytes without sperm chromatin inside the ooplasm (Chapter V). In general, these results indicate that oocyte and sperm quality can only be assessed after IVF if the fertilization outcome of cohort oocytes is taken into account.

The sequential transformations of human sperm nuclei in oocytes after SUZI (n=139) were compared to those of zygotes obtained after IVF with donor spermatozoa (D-IVF; n=220) by non-invasive observations. For most zygotes, pronuclear formation took place between 4.5 h and 10.5 h post-SUZI. They remained visible for  $\approx 13$  h and began to disappear 18.5 h post-SUZI. D-IVF zygotes had a similar rate of pronuclear disappearance but  $\approx 4$  h later. The second cell cycle was more rapid for zygotes obtained by D-IVF than by SUZI. The developmental rate of zygotes obtained by SUZI varied according to sperm phenotypes. For patients with unexplained fertilization failures and normal spermatozoa, the oocyte quality seemed implicated (Chapter VI).

From 33 out of 104 earlier described IVF cycles 67, 48 h old embryos were observed. Of these embryos 31.3% contained only single nucleated cells and 65.7% had at least one multinuclear blastomere (2 embryos were not analysable). The incidence of embryos with multinuclear blastomeres tended to be higher in cycles with mono- and polyspermic fertilization of cohort oocytes ( $1.7 \pm 1.7$  versus  $0.9 \pm 0.7$  respectively). For these cycles, the number of oocytes retrieved and the monospermic fertilization rate were both significantly higher than for cycles with only monospermic fertilization. Multinucleation can result after the fertilization of oocytes which are unable to support normal nuclear and cell division because of immaturity or impaired quality. These oocytes are simultaneously retrieved with mature, fertilizable oocytes after ovarian stimulation (Chapter VII).

In conclusion, analysis of fertilization failures or abnormal embryo development after IVF as well as early embryo development after SUZI and D-IVF can give important information about the capacity of female and male gametes to interact in vitro and to generate viable embryos. This information allows to orient further infertility treatment toward the male, the female, or both partners.

## SAMENVATTING

Bevruchting met behulp van in vitro technieken zoals in vitro fertilisatie (IVF), subzonale inseminatie (SUZI) en intracytoplasmatische inseminatie (ICSI), is zelden voor 100% succesvol. In deze studie hebben we ons zowel beziggehouden met de oorzaken voor het uitblijven van bevruchting als met abnormale bevruchtingsprocessen na IVF. Onbevruchte eicellen, vertraagde zygoten en zygoten gestopt in hun ontwikkeling evenals embryos die niet geschikt waren voor transplantatie, zijn meestal 48 uur na de in vitro inseminatie geobserveerd. De intra- en extracellulaire DNA bevattende structuren (celkernen en spermatozoïden gebonden aan de zona pellucida) zijn bestudeerd na in vitro incubatie met de DNA specifieke, fluorescerende kleurstof Hoechst 33342. Een aantal eicellen (n=26) is vervolgens gefixeerd en tot coupes verwerkt ten behoeve van klassieke licht-microscopie. Beide technieken leverden vergelijkbare waarnemingen op.

In Hoofdstuk II, worden de volgende bevindingen besproken: sperma penetratie in zowel rijpe als niet rijpe eicellen, decondensatie van spermakernen, vroegtijdige condensatie van spermachromatine, polyspermie, pronucleus formatie en verouderingsprocessen van de eicel zoals, centrale migratie van de metafase II chromosomen, de formatie van een restitutie nucleus en de dislocatie van individuele chromosomen. Van 10 patiënten (12 IVF cycli) met dergelijke waarnemingen zijn de klinische gevolgen beschreven. Vier oorzaken zijn gevonden voor de lage bevruchtings- en klievings-ratio (0-20%): (1) sperma van onvoldoende kwaliteit, (2) niet volledig gerijpte eicellen, (3) verlate bevruchting, (4) eicel afwijkingen die tot uiting komen in de morfologie van het chromatine (Hoofdstuk III).

Het aantal spermatozoa stevig gebonden aan of gedeeltelijk gepenetreerd in de zona pellucida, is gerelateerd aan de aanwezigheid van sperma chromatine in het eicel-cytoplasma (zonder pronucleus formatie). Bovendien waren beide factoren gerelateerd aan het wel of niet voorkomen van bevruchting in eicellen die tegelijk werden verkregen. In sommige gevallen zijn de sperma-zona adhesie en de sperma penetratie niet met elkaar gecorreleerd; zo was de sperma-zona adhesie succesvol maar niet de sperma penetratie en vice versa. Deze dissociatie is mogelijk het gevolg van afwijkingen van de spermatozoa of van de zona-pellucida (Hoofdstuk IV).

In een serie van 440 onbevruchte eicellen en zygoten was de meerderheid van de eicellen in het metafase II stadium (63,4%), 14,8% was niet rijp (germinal vesicle stadium), 7,0% was geactiveerd, 6,8% had pronuclei en 8,0% had een abnormale morfologie van het eicelchromatine of was niet te analyseren. Sperma penetratie zonder pronucleus formatie werd vaak gevonden in niet rijpe, rijpe en geactiveerde eicellen (23,6%). Een subpopulatie van niet functionerende eicellen werd gevonden als de meerderheid van de tegelijk aanwezige eicellen bevrucht en na bevruchting gedeeld waren. Als geen, of slechts enkele van de tegelijk aanwezige eicellen bevrucht en gedeeld waren (met of zonder indicatie voor mannelijke onvruchtbaarheid) én als de onvruchtbaarheid van mannelijke oorsprong was, dan kan onvermogen tot sperma penetratie worden aangetoond door de aanwezigheid van post-

meiotisch verouderde eicellen, zonder sperma-chromatine in het eicel-cytoplasma (Hoofdstuk V). In het algemeen kan de eicel en sperma kwaliteit alleen worden geëvalueerd indien rekening gehouden wordt met de bevruchtingsresultaten na IVF van mede aanwezige eicellen.

De opeenvolgende transformaties van humane spermakernen in eicellen na SUZI (139 eicellen) werd vergeleken met die van zygoten verkregen na IVF met donor spermatozoïden (D-IVF, 220 eicellen) door middel van niet invasieve observaties. Voor de meeste zygoten vond pronucleus formatie tussen 4,5 uur en 10,5 uur post-SUZI plaats, de pronuclei bleven ongeveer 13 uur zichtbaar en begonnen vanaf 18,5 uur post-SUZI te verdwijnen. Pronuclei verdwenen met hetzelfde ritme in D-IVF zygoten maar dan ongeveer 4 uur later. De tweede cel-cyclus verliep sneller voor zygoten verkregen na D-IVF dan zygoten verkregen na SUZI. De ontwikkelingsnelheid van zygoten verkregen na SUZI hield verband met het sperma fenotype. Bij patiënten met niet te verklaren mislukkingen van de bevruchting met normaal sperma lijkt de eicel kwaliteit van invloed (Hoofdstuk VI).

Embryo's die niet geschikt waren voor transplantatie (67 embryo's), konden geobserveerd worden m.b.v. DNA fluorescentie. Deze embryo's waren afkomstig van 33 van de 104 eerder bestudeerde IVF cycli. Van de geobserveerde embryo's had 31,3% uitsluitend cellen met één enkele nucleus, 65,7% van de embryo's had minimaal één cel met meer dan één nucleus, en de twee resterende embryo's konden niet geanalyseerd worden. Embryo's met meerkernige cellen lijken vaker voor te komen als in eenzelfde cyclus mono- en polyspermie voorkomt dan wanneer alleen monospermie voorkomt ( $1,7 \pm 1,7$  en  $0,9 \pm 0,7$ ). In cycli met zowel mono- als polyspermische bevruchting worden hogere aantallen eicellen verkregen en een hogere monospermische bevruchtingsratio geconstateerd, dan in cycli met uitsluitend monospermische bevruchting. Meerkernigheid in cellen kan het gevolg zijn van de bevruchting van eicellen die ongeschikt zijn voor een normale kern- en celdeling veroorzaakt door onvoldoende rijping of onvoldoende kwaliteit en die gelijktijdig met rijpe, bevruchtbare eicellen zijn verkregen na een hormonale stimulatie van de ovaria (Hoofdstuk VII).

Tot conclusie; de analyse van onbevruchte eicellen en embryo's die na IVF ongeschikt zijn voor transplantatie evenals de analyse van vroege embryo-ontwikkeling na SUZI en D-IVF, kan belangrijke informatie leveren aangaande het vermogen van oocyten en spermatozoa tot interactie in vitro en om levensvatbare embryos te genereren. Deze informatie draagt ertoe bij dat de onvruchtbaarheidsbehandeling op de mannelijke of de vrouwelijke partner gericht kan worden.