

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013-2014

**VOORTPLANTINGSPROBLEMATIEK BIJ DE
VROUWELIJKE WITTE NEUSHOORN;
hot topic in verband met toenemende stroperij**

door

Margot VAN DE VELDE

Promotoren: Drs C. Ververs
Drs J. Govaere

Casusbespreking in het kader
van de masterproef

© 2014 Margot Van de Velde

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

VOORWOORD

Een reis naar Afrika laat een hele indruk op je na, zeker wanneer je er de kans krijgt om met wildlife te werken. Daarom wil ik in dit voorwoord eerst en vooral iedereen bedanken die deze stage mee mogelijk heeft gemaakt. Het was een geweldige ervaring waarbij ik zowel op diergeneeskundig vlak als op andere vlakken veel heb bijgeleerd.

Ik vond het ongelooflijk om met neushoorns te werken en hoe meer ik over deze dieren te weten kwam, hoe meer ik erover wilde weten. Daarom ook mijn welgemeende dank aan mijn promotor, dierenarts Cyriel Ververs, die me steeds met veel enthousiasme en interesse verder hielp bij het maken van een casusbespreking over neushoorns.

Als laatste zou ik graag mijn familie en vrienden willen bedanken die me enorm steunen in het doorlopen van deze studie. In het bijzonder een dikke merci aan mijn zus die eender wanneer voor me klaar stond om me te helpen met mijn 'horny-rhino' casuïstiek!



INHOUDSOPGAVE

VOORBLAD

TITELBLAD

VOORWOORD

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING	1
<u>Deel I: Inleiding</u>	2
1. Situering	2
2. Feiten en cijfers	3
3. Actieplannen.....	5
3.1. Tegengaan van de stroperij	5
3.2. Uitsterven voorkomen	5
<u>Deel II: Reproductie</u>	6
1. Anatomie geslachtstractus.....	6
2. Reproductiecyclus	9
2.1. Algemeen	9
2.2. Cycluslengte	9
2.3. Monitoring van de cyclus.....	13
➤ Gedragsveranderingen.....	13
➤ Veranderingen aan het geslachtsapparaat.....	13
➤ Rectaal onderzoek	14
➤ Echografie.....	14
➤ Hormonale analyse	15
3. Dracht.....	16
4. Reproductiestoornissen	17
4.1. Pathologieën ter hoogte van de geslachtstractus	17
4.2. Acycliciteit.....	19
4.3. Anovulatie	20
4.4. Vroeg-embryonale sterfte.....	21
5. Andere mogelijke oorzaken van de lage reproductiviteit in gevangenschap	22
5.1. Gedrag en huisvesting	22
5.2. Stress	23
5.3. Voeding	23
5.4. F ₁ versus F ₀	24
6. Geassisteerde voortplantingstechnieken	25
6.1. Oestrus en ovulatie inductie.....	25
6.2. Ovariële superstimulatie.....	26
6.3. OPU.....	27
6.4. IVM en IVF	28
6.5. ICSI.....	28
6.6. KI	28
BESPREKING	30
REFERENTIELIJST	32

SAMENVATTING

Stroperij vormt op dit moment een grote bedreiging voor neushoorns. Het in gevangenschap houden van de dieren en de daarmee gepaard gaande voortplantingsproblemen worden steeds belangrijker. Ondanks verschillende maatregelen lijkt het niet te lukken om de stroperij een halt toe te roepen, integendeel. Daarom is het van groot belang om de onwetendheden omtrent de reproductiviteit van neushoorns op te lossen. De vraag waarom neushoorns zich in het wild (zonder toedoen van de mens) wel kunnen onderhouden, maar in gevangenschap niet, houdt veel onderzoekers bezig. Er zijn reeds een aantal technieken ontwikkeld om het reproductief potentieel van de dieren beter te kunnen monitoren. Het routinematig gebruik van bijvoorbeeld echografie en de analyse van steroidhormonen in feces hebben al een aantal zaken aan het licht gebracht. Afwijkende cycli en acycliciteit zijn frequent voorkomende problemen bij neushoorns in gevangenschap. Pathologieën aan de geslachtstractus, zoals leiomyoma's of endometriumhyperplasie, komen eveneens niet zelden voor en zorgen voor een (sterk) gedaalde fertiliteit. Een deel van de problemen wordt toegeschreven aan 'reproductive aging', het vervroegd onvruchtbaar worden van voornamelijk wat oudere, cyclische dieren die zich nog nooit hebben voortgeplant. De hormonale invloed van de opeenvolgende cycli op het voortplantingsstelsel speelt hierin een grote rol. Met 'reproductive aging' kan zeker niet alles verklaard worden, ook het management en de omstandigheden waaronder de neushoorns worden gehouden spelen een grote rol. Met behulp van geassisteerde voortplantingstechnieken probeert men de reproductiecijfers van de neushoorns te verhogen. Technieken als kunstmatige inseminatie, ovum pick-up, *in vitro* fertilisatie, ... werden reeds toegepast maar staan allen nog in hun kinderschoenen.

Sleutelwoorden: Ceratotherium simum - gevangenschap - oestruscyclus - reproductieve problemen - stroperij

Deel I: Inleiding

1. Situering

In september 2013 ging ik op stage bij enkele Wildlife-dierenartsen in Zuid-Afrika. Hier werd ik al snel geconfronteerd met één van de grootste problemen van dit ogenblik: het stropen van neushoorns. De stroperij zorgt ervoor dat de neushoornpopulaties drastisch in aantal afnemen.

Uit angst dat de stropers ook bij hen zouden toeslaan, riepen vele eigenaars van Wildlifeparken de hulp in van de dierenarts om de hoorns preventief te verwijderen (figuur 1) of om de dieren te verplaatsen naar een kleinere en beter beveiligde omgeving.

Zodra de dieren geïmmobiliseerd zijn, worden er eenmalig stalen genomen voor DNA-analyse. De staalname bestaat uit het verzamelen van bloed, hoornschilders, een stukje huid (dat uit het oor weggesneden wordt) en enkele haren (inclusief haarwortels). Verder worden ook microchips ingeplant, zowel in de hoorn als in het dier zelf. Deze microchips zijn een hulpmiddel voor het identificeren van de neushoorns en het traceren van de hoorn. Andere maatregelen die genomen kunnen worden om de stroperij tegen te gaan zullen verder nog besproken worden.



Fig. 1: Foto genomen tijdens mijn stage in een wildpark in Zuid-Afrika, na het onthoornen van een witte neushoorn.

Om te voorkomen dat deze prachtige diersoort zou uitsterven, probeert men de neushoorns in gevangenschap te houden en te laten voortplanten. Dit heeft geleid tot verschillende fokprogramma's die jammer genoeg nog weinig hebben opgeleverd. In vergelijking met de situatie in het wild, planten de neushoorns zeer slecht voort in gevangenschap. De exacte oorzaak hiervan is nog niet gekend.

Daar ik zeer geïnteresseerd ben in zowel Wildlife als voortplanting, wilde ik graag meer weten over deze problematiek. Bovendien behoren neushoorns, net zoals Equidae en tapirs, tot de Perissodactyla of onevenhoevigen. Dit maakt het voor mij, met als afstudeerrichting 'Optie Paard', helemaal interessant. Doorheen de tekst worden dan ook regelmatig vergelijkingen gemaakt tussen beide species.

Hieronder volgt een uiteenzetting van wat reeds gekend is over de reproductieve fysiologie en pathologie bij neushoorns, en meer specifiek de witte neushoorn omdat ik hiermee het meest te maken kreeg tijdens mijn stage.

2. Feiten en cijfers

Vandaag de dag zijn er nog vijf overlevende neushoornsoorten, namelijk de zwarte en de witte neushoorn, welke in Afrika voorkomen en de Indische, Javaanse en Sumatraanse neushoorn, die in Azië terug te vinden zijn (IRF, 2013).

Van de Afrikaanse witte neushoorn (*Ceratotherium simum*) bestaan twee subspecies, namelijk de noordelijke witte neushoorn (*Ceratotherium simum cottoni*) en de zuidelijke witte neushoorn (*Ceratotherium simum simum*). De zuidelijke witte neushoorn was aan het einde van de 19^{de} eeuw bijna uitgestorven. Door middel van verschillende actieplannen om de soort te behouden, ging men van een populatie met nog amper 20 dieren in 1885 naar meer dan 8440 dieren in het wild vandaag. Bij dit aantal komen nog zo'n 700 dieren bij die wereldwijd in gevangenschap worden gehouden voor fokprogramma's (Emslie en Brooks, 1999).

Dankzij dit succesverhaal staat de zuidelijke witte neushoorn momenteel op de rode lijst van bedreigde diersoorten van de IUCN (International Union for Conservation of Nature, figuur 2) geklasseerd als 'Vulnerable'. Dit wil zeggen dat de zuidelijke witte neushoorn niet meteen met uitsterven bedreigd is, maar wel kwetsbaar is en afhankelijk van instandhoudingsmaatregelen.

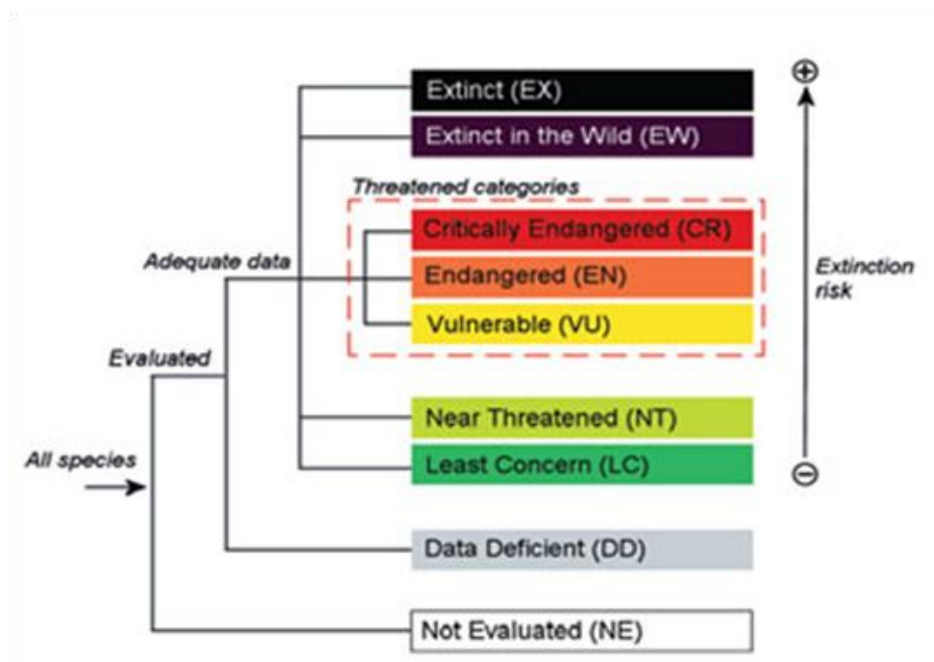


Fig. 2: Indeling van taxa volgens de IUCN (2012)

De noordelijke witte neushoorn daarentegen ging van een populatie van ongeveer 2250 dieren in 1996, naar een enkele populatie van zo'n 25 dieren in het wild en een 10-tal in gevangenschap

(Emslie en Brooks, 1999). Deze subspecies is daarom volgens de IUCN geklasseerd als 'Critically Endangered'.

De zwarte neushoorn (*Diceros bicornis*) staat al sinds 1996 op de rode lijst van de IUCN als ernstig met uitsterven bedreigd.

De soorten gaan allen een onzekere toekomst tegemoet. De stroperij gaat ondanks de verschillende maatregelen onverbiddeijk door.

Tussen 2007 en 2011 steeg de stroperij van Afrikaanse neushoorns in Zuid-Afrika met **3000%**! Uit recent gepubliceerde cijfers van het gouvernement van Zuid-Afrika blijkt dat er in 2013 opnieuw een angstaanjagend hoog aantal van 1004 gestroopte neushoorns werd bereikt (figuur 3). Bij het publiceren van deze officiële cijfers is 2014 nog maar drie weken bezig en zijn er reeds 42 neushoorns gestroopt in Zuid-Afrika. Dit zijn er twee per dag! (IRF, 2014)

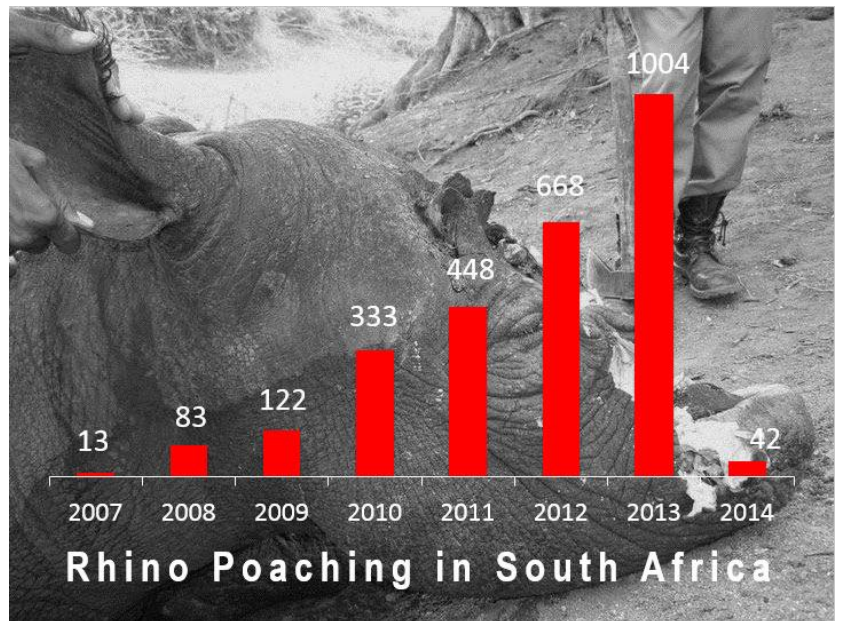


Fig. 3: Officiële aantallen voor wat betreft de stroperij van neushoorns in Zuid-Afrika (IRF, 2014)

Eén van de grootste oorzaken van de toenemende stroperij is de vraag naar hoorn. Deze hoorn wordt als ingrediënt gebruikt in de traditionele Chinese geneeskunde en in het Midden-Oosten om dolken uit te vervaardigen. In Vietnam is het bezitten van hoorn een statussymbool geworden. Bovendien denkt men dat de hoorn kanker kan genezen en gebruikt de bevolking het als 'party drug'.

Om deze 'kostbare' hoorn te bemachtigen brengen stropers de dieren op gruwelijke wijzen om het leven. De prijs op de zwarte markt varieert sterk, maar Vietnamese handelaars spraken anno 2012 van prijzen tot **105 euro per gram**. Dit is enorm veel, wetende dat beide hoornen van een zwarte neushoorn samen gemiddeld 2,88 kg wegen en deze van witte neushoorns gemiddeld 4 kg.

De handel in hoorn kan vergeleken worden met goud- en cocaïnehandel. Het brengt soms zelfs meer op! Er zijn dan ook complexe netwerken mee gemoeid, waarbij zelfs dierenartsen betrokken zijn. De bendes zijn steeds beter georganiseerd en bewapend. Ze maken gebruik van helikopters, nachtkijkers, oorlogswapens,... In enkele uren tijd is de hoorn al het land uit gevoerd..

Sinds 1977 staan neushoorns op Bijlage I van CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). In deze bijlage staan regels vermeld met betrekking tot handel in species die met uitsterven bedreigd zijn. De vermelding op deze lijst brengt met zich mee dat alle internationale handel in neushoorns en ervan afgeleide producten verboden is, tenzij een

specifiek certificaat voor import of export aangevraagd en goedgekeurd wordt bij de bevoegde autoriteit.

3. Actieplannen

3.1. Tegengaan van de stroperij

Er zijn reeds verschillende projecten opgericht om de neushoorns te beschermen tegen de stroperij. Een voorbeeld hiervan is het Rhino Rescue Project (RRP) dat in 2010 is ontstaan. Het doel van deze organisatie is om methoden te ontwikkelen die de waarde van de hoorn zouden doen afnemen. Dit willen ze bereiken door de hoorn te contamineren of te impregneren met een gekleurde stof of toxine. Een studie waarin werd onderzocht of de hoorn van neushoorns gebruikt kon worden als een depot vanwaar acariciden zich over de huid konden verspreiden voor de behandeling van ectoparasieten, bracht de onderzoekers van het RRP op ideeën. De acariciden zijn niet bedoeld om geconsumeerd te worden door mensen. Bij inname kunnen, afhankelijk van de dosis, symptomen van misselijkheid, braken en convulsies ontstaan, maar letaal zijn de producten niet in deze kleine hoeveelheden. Naast het acaricide wordt ook gebruik gemaakt van een onuitwisbare kleurstof die de behandelde hoornen kleurt. Deze kleurstof is bovendien zichtbaar op RX, zelfs als de hoorn tot een fijn poeder vermalen is. Deze eigenschap is zeer handig bij controles in luchthavens.

Zoals ik reeds in de inleiding vermeld heb, worden ook DNA-stalen genomen wanneer een dier verdoofd is. Het nemen van de stalen gebeurt met behulp van een RHODIS (Rhino DNA Index System)-kit. De stalen worden vervolgens verzonden naar Onderstepoort (faculteit diergeneeskunde) in Zuid-Afrika, waar de informatie aan een nationale database wordt toegevoegd.

Bij maatregelen als onthoorning of het behandelen van hoorn met een product, dient benadrukt te worden dat dit regelmatig herhaald zal moeten worden vermits de hoorn van een neushoorn gedurende zijn hele leven blijft groeien. De hoorn bestaat, net zoals de hoeven van een paard of onze vingernagels, uit keratine. Een volledige groeicyclus bedraagt drie tot vier jaar.

3.2. Uitsterven voorkomen

Om te voorkomen dat de nog bestaande soorten zouden uitsterven werkt men verschillende instandhoudingsprocedures uit. Translocatie is er daar één van. Dit is noodzakelijk om neushoorns te herintroduceren in gebieden waar ze niet meer of slechts in beperkte aantallen voorkomen door stroperij of door ander menselijk ingrijpen.

Ook in de omgekeerde situatie waarbij er een overbevolking bestaat in een bepaald gebied, biedt translocatie een uitkomst. Het doel ervan is om de groeisnelheid van een bepaalde neushoornpopulatie zo snel mogelijk te doen stijgen (Emslie *et al.*, 2009). Dankzij dit proces wordt inteelt voorkomen en wordt ervoor gezorgd dat de dieren in een bepaald gebied voldoende voedsel en dergelijke tot hun beschikking hebben.

Een andere manier voor het in stand houden van de verschillende neushoornspecies, is het opstellen van fokprogramma's voor dieren die in gevangenschap worden gehouden. In gevangenschap zijn ze minder kwetsbaar voor stropers. Vaak is het ook de bedoeling om de nakomelingen opnieuw in het

wild te herintroduceren. Jammer genoeg komen er veel problemen naar voor wanneer men neushoorns in gevangenschap wil laten voortplanten, met als gevolg dat er onvoldoende nakomelingen verkregen worden om de soorten te onderhouden. De groeisnelheid in gevangenschap bedraagt – 3,5%, terwijl deze in het wild 6-10% bedraagt (Emslie en Brooks, 1999).

De reproductieve fysiologie van deze dieren moet nog beter begrepen worden om een oplossing te vinden voor deze alarmerend lage geboortecijfers in gevangenschap.

Deel II: Reproductie

1. Anatomie geslachtstractus

Het is onmogelijk de oorzaak van de reproductieve problemen van de neushoorns te achterhalen indien de anatomie van de geslachtstractus onvoldoende gekend is. De anatomie is verder ook zeer belangrijk om geassisteerde voortplantingstechnieken te ontwikkelen.

Godfrey *et al.* (1991) hebben de anatomie van het voortplantingsstelsel van drie zwarte (*Diceros bicornis michaeli*) en twee witte (*Ceratotherium simum simum*) vrouwelijke neushoorns bestudeerd. De verschillende onderdelen werden opgemeten en de resultaten worden hieronder weergegeven in tabel 1. Uit de tabel valt af te leiden dat de afmetingen verschillen tussen de zwarte en witte neushoorn, maar ook tussen de verschillende leeftijdscategorieën.

	Black rhinoceros			White rhinoceros	
Studbook N°	2058	367	38	751	45
Age	7 days	3 years	28 years	21 years	27 years
Length of Vestibule ^a					
- Cm	6,8	/ ^d	15,5	19,6	14,3
- % ^b	19,6	/	14,5	18,5	15,3
Vagina ^c					
- Cm	14,1	25,0	22,1	30,1	19,0
- %	40,6	34,5	20,7	28,4	20,3
Cervix					
- Cm	2,8	10,5	17,0	13,0	12,0
- %	8,1	14,5	15,9	12,3	12,9
Uterine body					
- Cm	0,5	2,7	5,5	3,5	7,5
- %	1,4	3,7	5,2	3,3	8,0
Uterine horns					
- Cm	10,5	34,3	46,5	39,9	40,6
- %	30,3	47,3	43,6	37,6	43,5
- Total (cm)	34,7	72,5	106,6	106,1	93,4
- Diameter of uterine horn ^e (cm)	0,5	1,5	2,0	3,1	4,0

^aVulva to distal surface hymen.

^bPercent of total tract length.

^cProximal surface of hymen to external cervical os.

^dVulva was missing from tract, so total length is reported without vestibule.

^eRepresents average of left and right horns.

Tabel 1: Metingen van het voortplantingsstelsel van zwarte en witte neushoorns (Godfrey *et al.*, 1991)

Schaffer *et al.* (2001) hebben de anatomie en histologie van zeven vrouwelijke zwarte neushoorns en zes vrouwelijke witte neushoorns onderzocht. Hierbij proberen ze zoveel mogelijk vergelijkingen te maken met zoogdieren waarvoor reeds verschillende voortplantingstechnieken bestaan en toegepast worden. Aan de hand daarvan weet men hoe bepaalde technieken aangepast zouden moeten worden om ze bij neushoorns te kunnen gebruiken.

De histologie is volgens de onderzoekers sterk vergelijkbaar met onze zoogdieren. De morfologie van de geslachtstractus daarentegen vertoont karakteristieken van verschillende diersoorten.

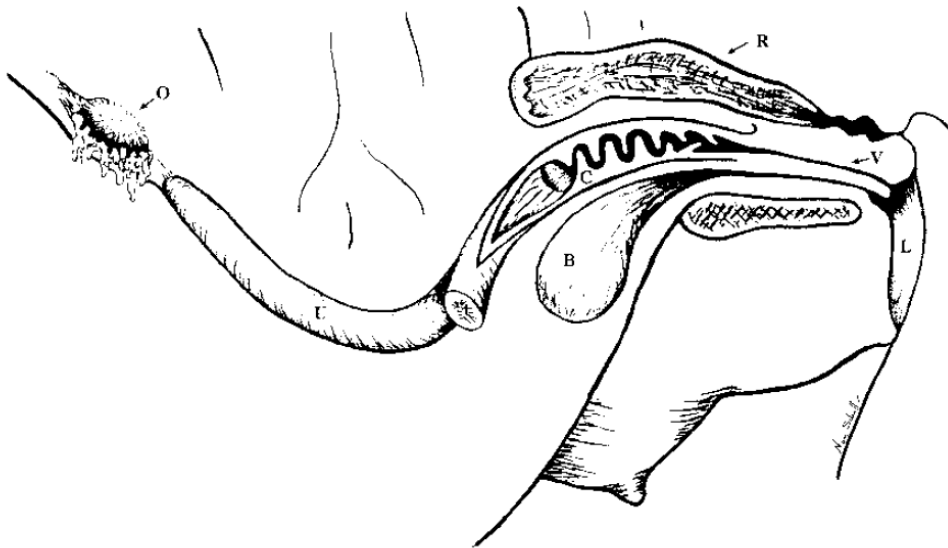


Fig. 4: Weergave van de abdominale oriëntatie van het voortplantingsstelsel van een Afrikaanse vrouwelijke neushoorn. O = ovaria; U = uterushoorn; C = cervix; V = vestibulum; L = vulva; B = urineblaas; R = rectum (Schaffer *et al.*, 2001).

De uterus en de ovaria zijn gelegen in het lumbale gebied en zijn door middel van een uterien ligament verbonden met de dorsale abdominale buikwand lateraal en caudaal van de nieren. Uit data van Schaffer *et al.* (2001) volgt dat de afstand van de ovaria tot aan de nieren (na meting bij één zwarte en drie witte nullipare neushoorns) $14,8 \pm 4,3$ cm bedraagt. Bij een multipare zwarte neushoorn bedroeg deze afstand 35 cm. De ovaria bevinden zich net craniaal van de uiteinden van de uterushoorns en kunnen in nauw contact staan met het colon.

De ovaria van zwarte en witte neushoorns zijn volgens Godfrey *et al.* (1991) vrij gelijkaardig in voorkomen, maar niet in grootte. De zwarte neushoorns hebben grotere ovaria in vergelijking met de witte neushoorns.

De ovaria van regelmatig cycliserende witte neushoorns zijn gemiddeld $34,1 \pm 4,5$ cm³ groot (Hermes *et al.*, 2006).



Fig. 5: Doorsnede doorheen een ovarium met fimbriae (F) van een zwarte neushoorn (Schaffer *et al.*, 2001)

Schaffer *et al.* (2001) vermelden dat de ovaria een platte en ovale vorm hebben wanneer ze inactief zijn en een ronde vorm wanneer ze ontwikkelende follikels of corpora lutea en/of cysten bevatten.

Ondanks dat neushoorns vele gelijkenissen vertonen met paarden, hebben ze geen ovulatiefossa en ovuleren ze op verschillende plaatsen aan de oppervlakte van de ovaria (Godfrey *et al.*, 1991).

De ovaria liggen in de ovariële bursa in een serosale invaginatie van het mediale deel van het uteriene ligament. De positie van het ovarium in de ovariële bursa varieert met de ovariële activiteit.

De oviducten bestaan uit dunne, gekronkelde buisjes die eindigen in omvangrijke fimbriae (figuur 5).

De anatomie van de uterus van de neushoorns lijkt volgens Godfrey *et al.* (1991) en Schaffer *et al.* (2001) op deze van de teef en de zeug. De uterus hoorns zijn namelijk relatief lang en het corpus klein ten opzichte van de rest van het voortplantingsstelsel. Het feit dat de hoorns zo lang zijn, is belangrijk om procedures voor bijvoorbeeld embryo-transplantatie te ontwikkelen. Alleen al het volume dat nodig zal zijn om een grondige spoeling uit te voeren is sterk gerelateerd aan de omvang van de uterus(hoorns).

Het endometrium van de neushoorns bestaat uit dunne longitudinale plooien, welke 0,5 tot 2 cm in het lumen uitpuilen. Deze plooien zijn vergelijkbaar met de endometriale plooivorming bij de merrie. Het myometrium is steeds prominent aanwezig.

Wat de placentatie betreft, hebben neushoorns een diffuse, epitheliochoriale placenta net zoals Suidae. Equidae hebben ook een epitheliochoriale placenta, maar deze wordt beschreven als microcotyledonair en ook de aanwezigheid van endometriale cups is kenmerkend voor deze diersoort (Carter en Enders, 2013).

De ophanging van de uterus is niet zo stevig waardoor de hoorns in een convexe curve in het mesometrium hangen. Zo lijkt het alsof het mogelijk is om de geslachtstractus bij rectaal onderzoek wat terug te trekken, maar het gewicht en de dikke wand van het rectum maken dit moeilijk (Schaffer *et al.*, 2001).

Ter hoogte van de bifurcatie konden Schaffer *et al.* (2001) een prominent intercornuaal ligament terugvinden. Het ligament kon bij de rectaal onderzoek niet gepalpeerd worden.

De cervix van neushoorns heeft excentrische ringen zoals ook gezien wordt bij Bovidae en Ovidae. Door deze ringen en de aanwezigheid van dikke, fibreuze cervicale plooien verkrijgt het lumen van de cervix een sterk gekronkeld verloop en is het vaak moeilijk om de uitwendige opening te definiëren (Godfrey *et al.*, 1991; Schaffer *et al.*, 2001). In het midden van de cervix interdigiteren de plooien en zorgen ze voor het afsluiten van het kanaal.

De structuur van de cervix maakt het inbrengen van een katheter doorheen het lumen moeilijk. Zo zullen bijvoorbeeld inseminatietechnieken en procedures voor embryo-transplantatie aan deze weinig doorgankelijke anatomische structuur aangepast moeten worden. Bovendien brengt ook de lengte van de cervix een extra moeilijkheid met zich mee voor eventuele voortplantingstechnieken.

In de vagina is er eveneens een sterke ploovorming aanwezig. In vergelijking met de dikke, fibreuze plooiën van de cervix, zijn deze in de vagina dunner en hebben ze scherpere randen.

Wat nog meer opvalt aan de geslachtstractus van vrouwelijke neushoorns, is dat bij elk dier in meer of mindere mate een hymen aanwezig is (geweest) juist voor de urethrale opening. Bij nullipare dieren is deze nog (bijna) volledig intact, terwijl bij een dier dat reeds nakomelingen heeft voortgebracht nog slechts restanten van de membraan aanwezig zijn (Godfrey *et al.*, 1991; Schaffer *et al.*, 2001). De aan- of afwezigheid van de membraan bij een neushoorn leert ons dus iets over de reproductieve status van een dier. Als de membraan nog volledig intact is heeft er nog geen succesvolle paring plaatsgevonden (Hermes *et al.*, 2006).

Een suburethraal divertikel is niet aanwezig bij neushoorns (Schaffer *et al.*, 2001).

De vulvalippen zijn volgens Schaffer *et al.* (2001) aan de ventrale zijde groter dan aan de dorsale zijde. De clitoris is aanwezig in een fossa in de ventrale commissuur.

2. Reproductiecyclus

2.1. Algemeen

Neushoorns in het wild worden beschreven als polyoestrisch en niet-seizoenaal (Garnier *et al.*, 2002). Volgens Hermes *et al.* (2006) start de folliculaire activiteit bij witte neushoorns op een leeftijd van drie tot vier jaar. De dieren vertonen dan reeds folliculaire golven, maar hierbij treedt nog geen ovulatie op. Witte neushoorns ovuleren spontaan¹. Na de puberteit, op zo'n vier tot vijfjarige leeftijd, zouden ze moeten beginnen ovuleren en luteale activiteit vertonen. De trigger die zorgt voor het induceren van ovulaties en regelmatige luteale activiteit in volwassen geslachtsrijpe vrouwelijke dieren is nog niet gekend. Het is mogelijk dat sociale hiërarchie hierbij een rol speelt (Hermes *et al.*, 2006).

Zoals bij de meeste zoogdieren, treedt ook bij de neushoorn ovulatie op na een enkelvoudige, pre-ovulatoire LH-piek. Er is veel variatie tussen de neushoornspecies wat de grootte van de pre-ovulatoire follikels betreft. Bij witte neushoorns worden afmetingen gevonden van 30-34 mm (Radcliffe *et al.* 1997, 2001; Roth *et al.* 2001, 2004; Hermes *et al.*, 2007). Dit is relatief klein wanneer je vergelijkt met de merrie. Op het tijdstip van de ovulatie hebben ze meestal een diameter van 40-45mm (Brinsko *et al.*, 2011). De Indische neushoorn breekt echter alle records met follikels tot 120 mm in diameter (Stoops *et al.*, 2004).

2.2. Cycluslengte

Er dient nog veel onderzoek te gebeuren naar de reproductieve biologie van de witte neushoorn. Over vele zaken zijn onderzoekers het nog niet met elkaar eens. De cycluslengte is hier een voorbeeld van (tabel 2).

¹ Net zoals de zwarte en Indische neushoorns. Bij de Sumatraanse neushoorn daarentegen vindt een geïnduceerde ovulatie plaats.

<u>Auteur</u>	<u>Jaartal</u>	<u>Methode</u>	<u>Cycluslengte (dagen)</u> (species + aantal (n))
Wagner	1986	Rectaal onderzoek; Vaginale cytologie; Hormonale analyse (progesteron en oestrogeen in urine)	40-42 [38-58] (zWNH, n = 1)
Hindle <i>et al.</i>	1992	Hormonale analyse (progesteron en oestrogeen in urine); Gedragsobservaties	32 (zWNH, n = 1) 25 (nWNH, n = 1)
Radcliffe <i>et al.</i>	1997	Echografie; Hormonale analyse (progesteron in feces)	31, 35 (zWNH, n = 1)
Schwarzenberger <i>et al.</i>	1998	Hormonale analyse (progesteron in feces)	± 70^R ± 30 - ± 70^{OR} (zWNH, n = 16; nWNH, n = 4)
Patton <i>et al.</i>	1999	Hormonale analyse (progesteron in feces); Gedragsobservaties	35,4 ± 2,2^R - 65,9 ± 2,4^{OR} (zWNH, n = 13)
Strike en Pickard	2000	Hormonale analyse (progesteron in feces, urine en plasma)	32 ± 1,85 (zWNH, n = 8)
Brown <i>et al.</i>	2001	Hormonale analyse (progesteron in feces)	32,8 ± 1,2^R - 70,1 ± 1,6^{OR} (WNH, n = 13)
Carter <i>et al.</i>	2005	Hormonale analyse (progesteron in feces); Gedragsobservatie; Vulvazwelling	29,6 ± 1,8 (zWNH, n = 3)
Morrow <i>et al.</i>	2008	Hormonale analyse (progesteron in feces); Gedragsobservaties	31,6 ± 0,6^R 31,9 ± 0,9 - 67,2 ± 1,3^{OR} (zWNH, n = 3)

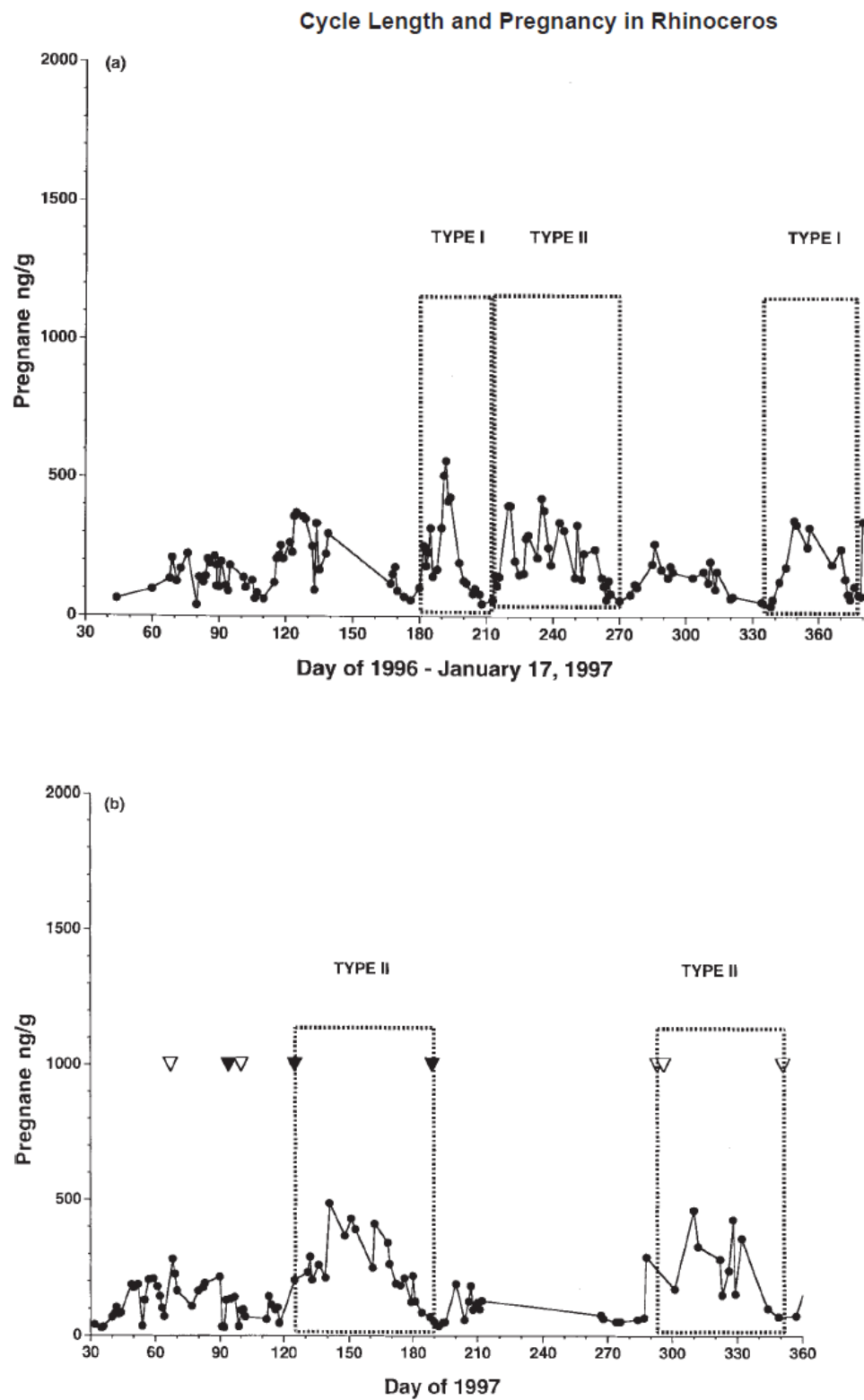
^RRegelmatig cyclerende dieren

^{OR}Onregelmatig cyclerende dieren

Tabel 2: Weergave van verschillende resultaten die verkregen werden bij studies naar cycluslengte van neushoorns gehouden in gevangenschap. zWNH = zuidelijke witte neushoorn, nWNH = noordelijke witte neushoorn.

Wat opvalt in bovenstaande tabel, is dat de bekomen resultaten van de verschillende studies sterk variëren. Wel is er min of meer een patroon in terug te vinden. Enerzijds zijn er cycli van 25-35 dagen en anderzijds van 65-70 dagen. Dit onderscheid werd ook beschreven door Patton *et al.* (1999). Deze onderzoekers hebben progesteronmetabolieten gemeten in feces en gedragspatronen geobserveerd van 13 zuidelijke witte neushoorns in gevangenschap. Hierbij constateerden ze dat de bronstcycli in twee grote groepen onder te verdelen zijn. De cycli die ongeveer een maand duren werden type I genoemd en de cycli van ongeveer twee maanden, beschreven ze als type II. Deze type II cycli

worden gekenmerkt door een luteale fase die meer dan tweemaal zo lang duurt in vergelijking met de luteale fase van type I cycli (figuur 6).



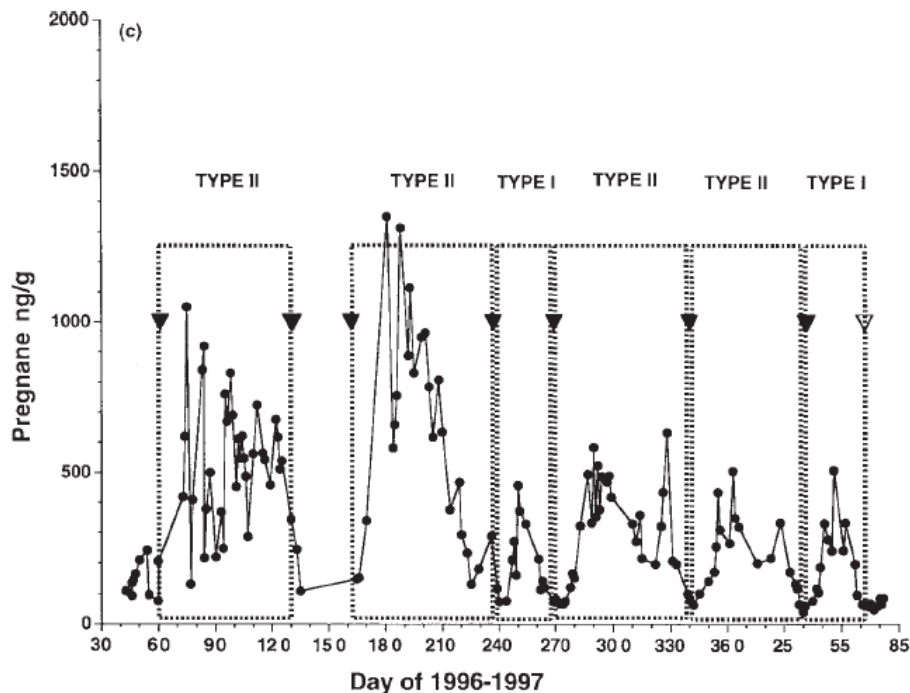


Fig. 6: Concentraties van pregnane in de feces van zuidelijke witte neushoorns illustreren de type I en type II cycli. **a:** Dumisha, februari 1996 – januari 1997. **b:** Dumisha, 1997. **c:** Sinyaa, februari 1996 – april 1997. De cycli worden weergegeven met een stippellijn, de gevulde driehoekjes geven copulaties weer en lege driehoekjes staan voor dekgedrag zonder copulatie. (Patton *et al.*, 1999)

Voortgaand op deze twee cyclustypes, werd door Radcliffe *et al.* (1997), Schwarzenberger *et al.* (1998) en Patton *et al.* (1999) algemeen aanvaard dat type I cycli fertiele cycli waren en type II cycli infertiel, vermits er nog geen enkele dracht was gerapporteerd na bevruchting van een dier met een 65-70 dagen cyclus. Het was ook kenmerkend dat type II cycli meer voorkwamen bij witte neushoorns ouder dan 20 jaar en specifiek bij deze die zich niet constant hadden voortgeplant gedurende hun leven (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001).

Ondertussen heeft onderzoek van Hermes *et al.* (2004, 2006) uitgewezen dat de afwijkende type II cycli waarschijnlijk veruiterlijkingen zijn van reproductieve pathologieën, waarover verder meer.

De hierboven vermelde onderzoeken vonden steeds plaats bij neushoorns die in gevangenschap werden gehouden. Op basis van gedragsobservaties in het wild constateert Bertschinger (1994) een cyclusbetengte van gemiddeld 28 dagen en Owen-Smith (1998) een cyclusbetengte van gemiddeld 30 dagen. Meer accurate technieken zoals het analyseren van bloed- en/of urinestalen zijn bij wilde dieren uiteraard niet evident. Het nemen van fecesstalen is wel mogelijk, maar een moeilijkheid hierbij is het terugvinden van de wilde dieren. Van der Goot (2009) is werkzaam in dit gebied en beschrijft het gebruik van radio transponders om de dieren te lokaliseren.

Voor dieren in gevangenschap zijn reeds progesteronprofielen opgesteld voor het analyseren van dit hormoon in feces. Van der Goot (2009, 2013) doet onderzoek naar het opstellen van een dergelijk profiel voor wilde neushoorns. Meer gegevens zijn vereist om de reproductie van wilde dieren aan de hand van fecesstalen te monitoren.

2.3. Monitoring van de cyclus

➤ Gedragsveranderingen

Aan de hand van typische bronstsymptomen die neushoorns voor een periode van maximaal 24h vertonen, kan de oestrus opgemerkt worden. Net zoals de merrie maken ze kleine plasjes urine, gaan ze de staart wat hoger dragen en laten ze een benadering toe van mannelijke dieren. Sommige vrouwelijke dieren vertonen 'sta-gedrag' wanneer de stier het hoofd op haar romp legt (Radcliffe *et al.*, 1997).

➤ Veranderingen aan het geslachtsapparaat

Carter *et al.* (2005) hebben een studie uitgevoerd naar de relatie tussen zwelling van de vulva en het begin van de oestrus bij drie zuidelijke witte neushoorns, gehouden in gevangenschap. Hiervoor hebben ze gebruik gemaakt van een scoresysteem van 0 tem 3, waarbij 0 'geen zwelling' voorstelt, 1 'matige verdikking', 2 'gezwollen' en 3 staat voor 'zeer gezwollen'. De zwelling is niet diffuus, maar eerder blaasvormig. Score 0 is typisch voor de anoestrus of luteale fase en score 3 voor oestrus (figuur 7). Uit de studie is gebleken dat de mate van vulvazwelling bij sommige individuen een eenvoudige, bijkomende aanwijzing kan zijn voor een naderende oestrus.



Fig. 7: Vulvascore bij een witte neushoorn. Li: score 0; Re: score 3, de pijl duidt de typische 'blaasvorm' aan (Carter *et al.* 2005)

Een verandering die niet uitwendig zichtbaar is, is de kleurverandering van de vaginale mucosa. De vaginale mucosa verandert van bleek roze in dioestrus, naar rood en hyperemisch zo'n twee dagen voor de oestrus tot 3 dagen erna (Radcliffe *et al.*, 1997).

➤ Rectaal onderzoek

De grootte en de lengte van het geslachtsstelsel, samen met de abdominale positie ervan en de dikte van de rectumwand beperken sterk de toegankelijkheid (Schaffer *et al.*, 2001). Rectale manipulatie van de uterusshoornen en de ovaria is enkel mogelijk bij kleine neushoorns.

Volgens Wagner *et al.* (1986) kan rectaal onderzoek een nuttig hulpmiddel zijn bij het bepalen van het cyclusstadium. Zij hebben namelijk aangetoond dat er een sterke correlatie is tussen het cyclusstadium van neushoorns en de tonus van de geslachtstractus.

Aan de cervix en uterus werd een score gegeven van 1 tot en met 3, waarbij 1 stond voor 'zacht, plooibaar en slap' en 3 voor 'hard, stevig en goed afgelijnd'. Volgens Wagner *et al.* (1986) zou de tonus van de geslachtstractus toenemen tot een score van 2 bij een naderende oestrus. Bij de bronst zelf zou de tonus gedurende twee tot vier dagen score 3 hebben, gevolgd door een snelle afname tot score 1 of 2.

➤ Echografie

Verschillende onderzoekers hebben geprobeerd het voortplantingsstelsel met echografie in beeld te brengen. Door de lengte kan manueel enkel de cervix en het caudale deel van de uterus in beeld worden gebracht. Om de uterus meer craniaal te kunnen bekijken en ook de ovaria in beeld te krijgen moet er gebruik worden gemaakt van een verlengstuk. Beehler (1990) gebruikte hiervoor een staaf en vond een afstand van de vulva tot aan de ovaria van 70 cm bij de zwarte neushoorn en 90 cm bij de witte neushoorn. Radcliffe *et al.* (1997) hebben de cycli van een 33-jarige witte neushoorn gedurende bijna een jaar echografisch opgevolgd. Hiervoor maakten ze gebruik van een 5 MHz convex array sonde en een verlengstuk van 122 cm (figuur 8). Schaffer *et al.* (2001) spreken van verlengstukken van 100 tot 122 cm bij witte neushoorns en tot 70 cm bij zwarte neushoorns.

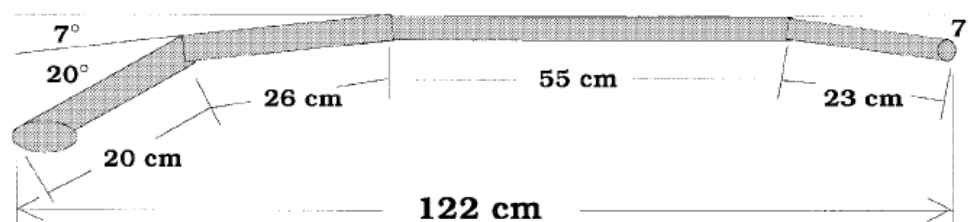


Fig. 8: Tekening van een verlengstuk voor het toepassen van echografie bij de neushoorn.

Radcliffe *et al.* (1997) deden verschillende vaststellingen bij de echografische opvolging van een witte neushoorn. Volgens hen had de pre-ovulatoire follikel een gemiddelde diameter van 30 mm (28-33, n=4) in de 48h voor de oestrus. In diezelfde periode vond ook een verandering van de folliculaire vorm plaats, deze werd namelijk peervormig in de plaats van sferisch (figuur 9). De vorming van een dominante pre-ovulatoire follikel ging samen met een weinig actief contralateraal ovarium.

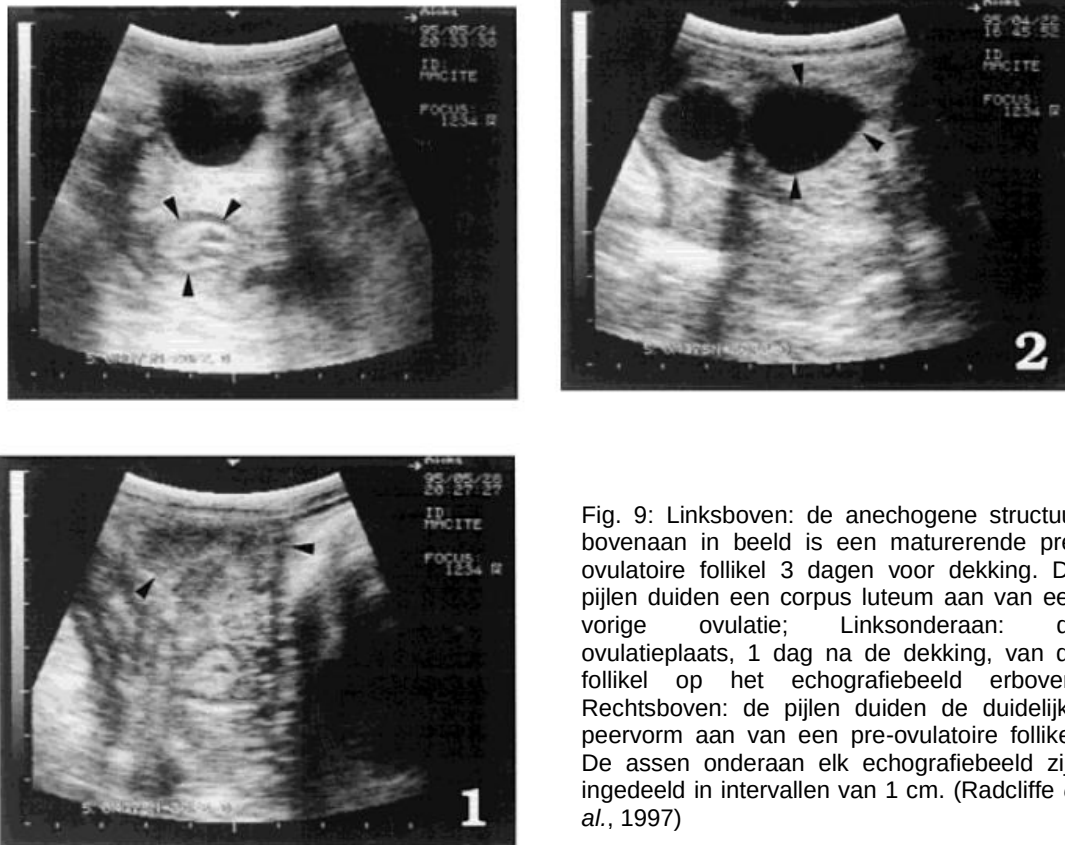


Fig. 9: Linksboven: de anechogene structuur bovenaan in beeld is een maturerende pre-ovulatoire follikel 3 dagen voor dekking. De pijlen duiden een corpus luteum aan van een vorige ovulatie; Linksonderaan: de ovulatieplaats, 1 dag na de dekking, van de follikel op het echografiebeeld erboven; Rechtsboven: de pijlen duiden de duidelijke peervorm aan van een pre-ovulatoire follikel. De assen onderaan elk echografiebeeld zijn ingedeeld in intervallen van 1 cm. (Radcliffe *et al.*, 1997)

Binnen de 24h na dekking vond de ovulatie plaats. Ovulatie was echter niet altijd aanwezig. De eerste maanden van de opvolging (januari-maart) was er wel folliculaire activiteit, maar vond er geen ovulatie plaats. Deze periode ging dan ook gepaard met lage concentraties aan progesteron, waarover verder meer.

➤ Hormonale analyse

Analyse van bloedstalen is een methode waarbij onmiddellijk informatie verkregen wordt over de endocriene status van een dier. Er worden niet alleen gegevens verkregen over steroiden, zoals oestrogenen en progestagenen maar ook over eiwithormonen zoals het luteïniserend hormoon (LH), het follikelstimulerend hormoon (FSH), inhibine, relaxine en prolactine. Het nadeel van deze methode is dat de neushoorns stress ondervinden bij het nemen van de bloedstalen.

Niet-invasieve methoden zoals het bepalen van hormoonconcentraties in urine en/of feces, omzeilen deze stressfactor en zijn van groot belang voor het analyseren van de reproductieve biologie van neushoorns in gevangenschap en in het wild.

In een studie van Hildebrandt *et al.* (2007) werden pregnane concentraties in plasma en in feces gemeten en vergeleken voor het diagnosticeren van dracht. Hieruit bleek dat de concentraties van pregnane in plasma de gebeurtenissen volgend op de ovulatie meer correct weergaven in vergelijking met pregnane concentraties in de feces. Dit in tegenstelling tot de informatie over de

drachtigheidsstatus in de witte neushoorn drie tot vier maanden na de conceptie, waarbij de pregnane concentratie in de feces het meest accuraat bleek.

3. Dracht

Na de olifant heeft de neushoorn de langste drachtduur van alle zoogdieren, deze varieert namelijk van 15-18 maanden (Hermes *et al.*, 2007). De grote variatie kan toegeschreven worden aan de moeilijkheid om het exacte tijdstip van de conceptie te bepalen. De leeftijd waarop een eerste dracht plaatsvindt in het wild, varieert van 5,6-8 jaar (Owen-Smith, 1998; Patton *et al.*, 1999).

Dracht kan gediagnosticeerd worden met behulp van echografie of door het bepalen van progesteronconcentraties, zowel in serum als in feces.

Met behulp van echografie kan het vruchtblaasje reeds onderkend worden vanaf 15 dagen na de ovulatie (Radcliffe *et al.*, 1997). Het embryo zelf is volgens Radcliffe *et al.* (1997) bij de witte neushoorn zichtbaar vanaf D23 en de hartslag op D26.

De vroeg embryonale ontwikkeling bij neushoorns is volgens een intensieve echografische studie van Radcliffe *et al.* (1997) sterk vergelijkbaar met deze bij Equidae.

De endocriene monitoring van de dracht kan daarentegen niet geëxtrapoleerd worden van het paard naar de neushoorn. Oestrone-sulfaat bijvoorbeeld kan gebruikt worden om de gezondheid van de foetus van de merrie in te schatten. Bij de witte neushoorn blijven de oestrogenconcentraties gedurende de hele dracht slechts in lage concentraties aanwezig en is dus voor deze diersoort geen nuttige indicator.

Verschillend van de merrie is ook dat bij neushoorns vermoedelijk geen endometriale cups gevormd worden. McFarlane *et al.* (1991) en Sherman *et al.* (1997) hebben dit onderzocht en veronderstelden dat neushoorns geen choriogonadotrofine produceren. Het is mogelijk dat neushoorns, net zoals de meeste andere zoogdieren, eiwitten produceren tijdens de vroege dracht die mee instaan om de dracht de onderhouden, maar hierover dient nog verder onderzoek te gebeuren.

Naar de progesteronconcentraties in feces van drachtige neushoorns werd al heel wat onderzoek verricht. Vanaf D50 van de dracht stijgen de progesteronconcentraties in de feces tot niveaus die significant hoger zijn dan de gemiddelde luteale concentraties die bij niet-drachtige neushoorns worden gevonden (Strike en Pickard, 2000). Deze bevindingen komen overeen met een studie van Patton *et al.* (1999) waarbij een stijging van progesteron in de feces genoteerd werd tussen de eerste en de derde maand van de dracht. Verder beschreven Patton *et al.* (1999) dat de concentraties blijven stijgen tot de zevende maand van de dracht. Daarna blijven ze ongeveer op hetzelfde niveau tot aan de partus. De bron van deze stijging van de hormonale concentraties is de placenta (of de foeto-placentale eenheid) (Schwarzenberger en Brown, 2013). Monitoring van de concentraties van progesteronmetabolieten wordt routinematig gebruikt om dracht te diagnosticeren bij neushoorns in gevangenschap.

Na de partus dalen de progesteronconcentraties om op dag vier post-partum weer op het basale niveau te zijn.

Progesteronconcentraties kunnen dus al vanaf twee maanden na de conceptie gebruikt worden om dracht te diagnosticeren in de witte neushoorn. Maar, frequente en regelmatige staalname is noodzakelijk voor een accurate interpretatie van de veranderingen in het longitudinale hormoonprofiel en om een voorspelling van de partusdatum te kunnen maken (Strike en Pickard, 2000)

Hildebrandt *et al.* (2007) hebben onderzoek gedaan naar het toepassen van KI tijdens de eerste postpartum oestrus om zo de tussenkalftijd zo kort mogelijk te houden. Door middel van echografische opvolging werd een involutie van de uterus met een complete resorptie van intra-uterien vocht en de ontwikkeling van een pre-ovulatoire follikel geconstateerd, 30 dagen postpartum.

Op basis van hormoonconcentraties in de feces bij neushoorns in gevangenschap bleek in een studie van Brown *et al.* (2001) dat vrouwelijke neushoorns binnen de drie maanden postpartum terug cyclisch werden.

Uit opvolging van data van witte neushoorns zowel in gevangenschap als in het wild, varieert de tussenkalftijd van 1,5 tot 3,45 jaar (Bertschinger, 1994; Owen-Smith, 1998; Hildebrandt *et al.*, 2007). In het wild wordt het kalf op een leeftijd van ongeveer 12 maanden gespeend, maar het blijft nog tot op 2-3 jarige leeftijd bij zijn moeder (Bertschinger, 1994).

4. Reproductiestoornissen

Hermes *et al.* (2004, 2006) kaartten het probleem aan van langdurige gevangenschap en de invloed ervan op het voortplantingsstelsel. Op basis van de onderzoeksresultaten stelden ze dat lange, niet-reproductieve perioden er mede voor zorgen dat pathologieën aan de geslachtstractus ontstaan en dat de folliculaire voorraad in de ovaria opgebruikt wordt. Er treedt dus een verlies op van het reproductief potentieel op een leeftijd waarbij de dieren normaal nog actief zouden moeten zijn.

4.1. Pathologieën ter hoogte van de geslachtstractus

Op 16-jarige leeftijd, wanneer de eerste pathologische veranderingen aan het genitaalapparaat zichtbaar worden, hebben cycliserende, niet-reproducerende vrouwelijke neushoorns al 90 bronstcycli vertoond. Deze verlengde blootstelling aan steroidhormonen van de voortdurende cyclische ovariële activiteit zou volgens Montali *et al.* (1997) zorgen voor de progressieve ontwikkeling van pathologieën aan de genitaaltractus (figuur 10) met subfertiliteit tot gevolg en, vermoedelijk, voor een verhoogd verbruik van de folliculaire voorraad met als eindstadium acycliciteit.

Een voorbeeld van dergelijke pathologieën zijn tumoren. De ontwikkeling van steroidhormoon-afhankelijke tumoren en de stimulatie van de tumorale groei door oestrogenen en progesteron verklaren de bevindingen in sommige niet-reproducerende maar wel continu cycliserende megavertebraten. Zo'n 80% van de letsels in niet-reproducerende vrouwelijke dieren wordt ingenomen door leiomyoma's en/of cisteuze hyperplasie van de geslachtstractus. Dit in tegenstelling tot een

incidentie van genitale pathologieën van minder dan 10% bij reproductieve, multipare witte neushoorns (Hermes et al, 2004).

De ontwikkeling van goedaardige reproductieve tumoren bij witte neushoorns is gelijkaardig aan deze gezien bij mensen en andere dieren. Een leiomyoma is een vaak gediagnosticeerde uteriene tumor bij vrouwen. Bij merries komen uterustumoren niet frequent voor, maar als er een tumoraal proces aanwezig is, gaat het meestal om een leiomyoma.

Net zoals gezien wordt bij vrouwen, neemt de tumorale ontwikkeling bij witte neushoorns in omvang toe met de leeftijd en zorgen waarschijnlijk na verloop van tijd voor een gedaalde fertiliteit (Hermes et al., 2006).

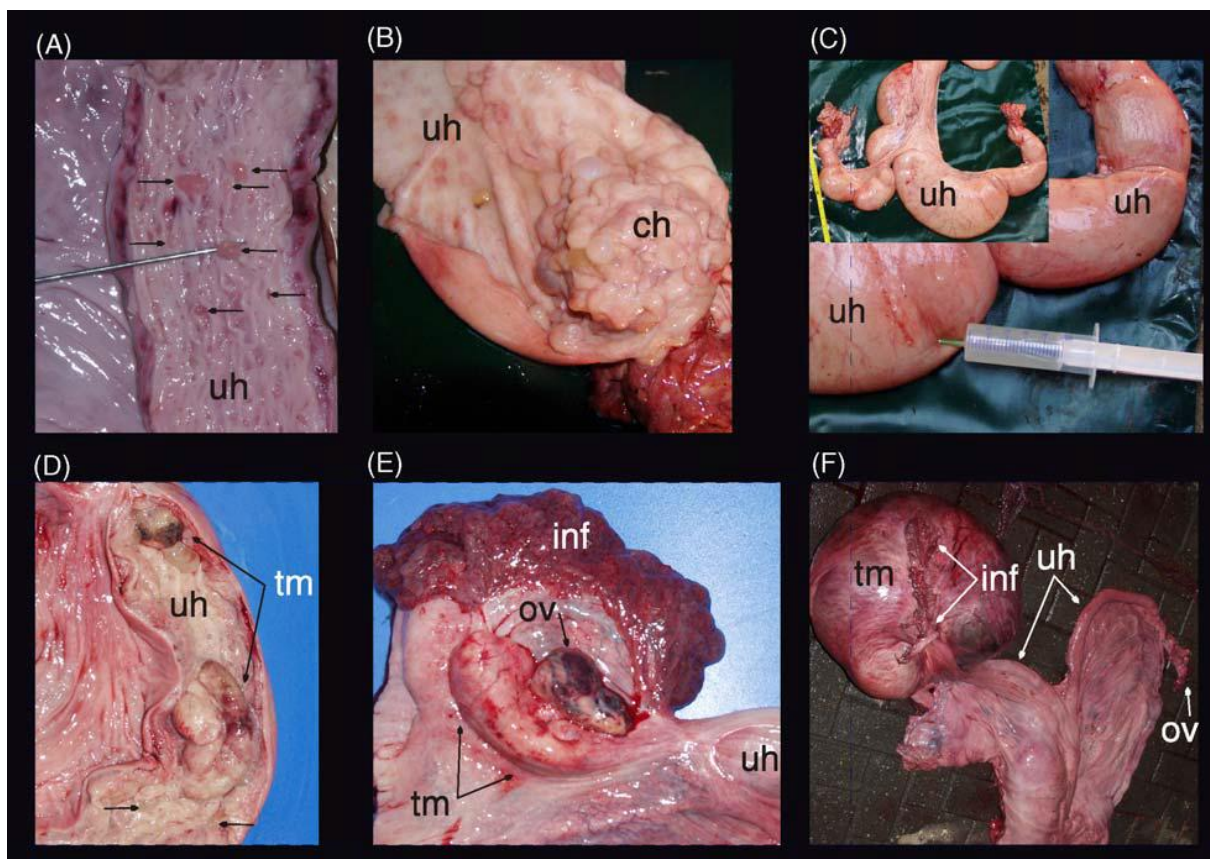


Fig. 10: Postmortem preparaten van pathologische bevindingen in het voortplantingsstelsel van witte neushoorns. (A) Multipiele endometriale cysten (pijlen) in de uteruschoorn (uh). (B) Multifocale cysteuze endometriumhyperplasie (ch) aan het einde van de uteruschoorn (uh) welke de opening van de oviduct bedekken. (C) Hydromucometra: corpus uteri en uteruschoorn (uh) zijn gevuld met drie liter vocht. (D) Focale, extensieve cysteuze endometriumhyperplasie (pijlen) en adenomateuze poliepachtige intraluminale protrusies (tm). (E) Leiomyoma (tm) in het mesovarium, vlakbij het ovarium (ov) aan de tegenovergestelde zijde van het infundibulum (inf). (F) Een para-ovarieel leiomyoma (tm) van 35 kg in een pluripare, cycliserende vrouwelijke neushoorn. (Hermes et al., 2006)

De meest voorkomende pathologische bevinding bij niet-reproducerende vrouwelijke witte neushoorns, is cysteuze hyperplasie. De hyperplasie komt frequenter en in ernstigere mate voor bij oudere nullipare individuen. Hormonale analyses in de feces wijzen uit dat er hierbij geen

detecteerbare luteale activiteit, en dus geen corpus luteum, aanwezig is. De folliculaire golven gaan wel gewoon door, wat zorgt voor blootstelling aan oestrogenen (Hermes *et al.*, 2006).

Bij een studie van Godfrey *et al.* (1991) viel op dat het endometrium van de oudere witte neushoorns (>20 jaar) hyperplastisch was. Over de gehele lengte van de uterusshoornen waren met vocht gevulde vesikels aanwezig. Er was een uniforme verdeling in aantal en grootte van de vesikels. Het vocht zelf was helder. Bij de oudere zwarte neushoorn (28 jaar) was een gelijkaardig fenomeen aanwezig. Alleen waren de vesikels niet zo groot, hadden een donkerbruine kleur en waren niet zo stevig als deze bij de witte neushoorns.

Bij de jongere dieren (7 dagen en 3 jaar) was er geen enkele indicatie tot hyperplasie van de uterusshoornen. Uit deze data lijkt de hyperplasie leeftijds-gerelateerd te zijn. Hormonale invloeden kunnen hierbij niet uitgesloten worden, vermits de omvang van de hyperplasie het grootst was in de witte neushoorn die behandeld was met progestine en gonadotropines.

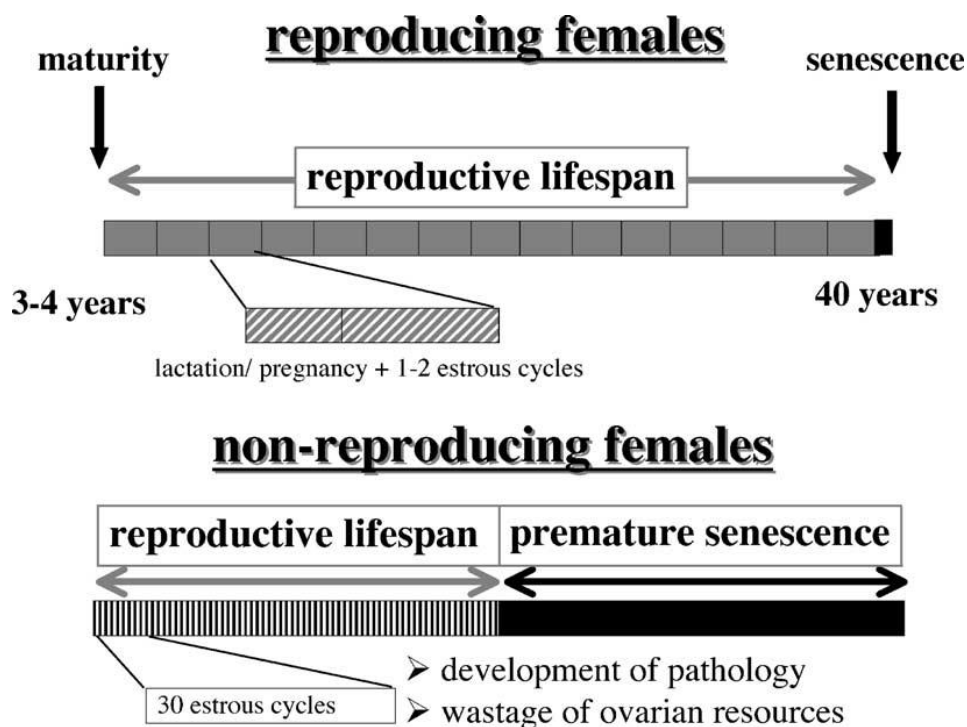
Volgens Godfrey *et al.* (1991) is het mogelijk dat deze hyperplasie interfereert met de fertiliteit van de neushoorns. Een abnormale groei van het endometrium kan interfereren met de implantatie en de ontwikkeling van het embryo in de uterus. Nog voor deze stadia zou de hyperplasie al een fysische barrière kunnen vormen voor de bevruchting door het occluderen van het uteriene lumen. Een ander nadeel van deze occlusie is het minder goed kunnen spoelen van het uteriene lumen bij embryotransplantatie.

Een andere vaak voorkomende pathologie zijn de para-ovariële cysten. Deze dunwandige, meestal unilaterale structuren bevinden zich tussen het ovarium en de uterus en kunnen zorgen voor een mechanische obstructie van de oviduct en/of voor drukatrofie van het ovarium. Para-ovariële cysten zijn net als endometriumhyperplasie gerelateerd aan de leeftijd en zijn pathognomonisch voor reproductieve veroudering. Dergelijke cysten worden ook beschreven bij merries en vrouwen (Hermes *et al.*, 2006).

4.2. Acycliciteit

Naast afwijkingen aan het voortplantingsstelsel, is acycliciteit een ander frequent voorkomend probleem bij de witte neushoorn. Verschillende studies tonen aan dat bijna 50 procent van de bestudeerde vrouwelijke dieren een inactief patroon vertoont (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

Een hypothese voor deze stopzetting van de cyclische activiteit is wat men noemt 'reproductive aging'. Langdurige bronstcycli zonder een daaropvolgende conceptie zorgen voor het verminderen van de gelimiteerde folliculaire voorraad. Als dit proces enige tijd doorgaat, resulteert het uiteindelijk in een irreversibele acycliciteit (Hermes *et al.*, 2004) (figuur 11). Bij dergelijke dieren worden kleine, inactieve ovaria teruggevonden in verschillende vormen.



Figuur 11: Schematische tekening van het reproductieve verouderingsproces van neushoorns in gevangenschap (Hermes *et al.*, 2004).

Het gaat dus duidelijk om een irreversibel proces, vandaar dat veranderingen in de omgeving met betrekking tot sociale interacties of hormonale therapieën hierbij geen hulp kunnen bieden.

In het wild komt dit probleem niet voor, vermits dracht en lactatie de meest voorkomende endocrinologische profielen zijn bij deze dieren. Onderzoek naar de endocrinologie en observaties van gedragingen van wilde vrouwelijke neushoorns tonen korte intervallen aan tussen opeenvolgende drachten (Owen-Smith, 1975; van der Goot, 2009). Mogelijk kennen ze maar een 30-tal bronstcycli gedurende hun reproductieve levensduur (Hermes *et al.*, 2004).

Dit staat in schril contrast met de situatie in gevangenschap, waarbij niet-reproducerende vrouwelijke dieren wel 310 bronstcycli kunnen vertonen.

4.3. Anovulatie

Soms vertonen neushoorns wel folliculaire activiteit, maar vindt er geen ovulatie plaats. Vaak gaan deze anovulatoire follikels in diameter toenemen en hemorrhagisch worden, men spreekt dan ook van hemorrhagische follikels (Radcliffe *et al.*, 1997). In de meeste gevallen zal de wand van de follikels luteïniseren en lage concentraties aan progesteron produceren (Roth, 2006). Na verloop van tijd zullen er steeds meer fibrinestrengen gevormd worden in het lumen van de follikels en na drie tot zes weken zullen deze structuren vanzelf verdwijnen. Dit gebeuren is sterk vergelijkbaar met wat gezien wordt tijdens de transitieperiode bij merries aan het begin en het einde van het dekseizoen. Af en toe komt anovulatie ook voor bij merries wanneer het dekseizoen al volop bezig is, hetgeen (in tegenstelling tot de anovulatie in de transitieperiode) wel als pathologisch wordt beschouwd. Wat hier

de oorzaak van is weet men niet (Brinsko *et al.*, 2011). Radcliffe *et al.* (2001) suggereerden dat anovulatie in de zwarte neushoorn ook geassocieerd is met een seizoensinvloed. Of dit bij witte neushoorns het geval is, moet nog onderzocht worden.

4.4. Vroeg-embryonale sterfte

Naast luteïnisatie van anovulatoire follikels, kan volgens Radcliffe *et al.* (1997) en Patton *et al.* (1999) vroeg-embryonale sterfte (EED) bij neushoorns eveneens gepaard gaan met een verlengde luteale activiteit door het behoud van het corpus luteum, zoals ook gezien wordt bij Ruminantia en Equidae. Initieel dacht men dat het probleem van EED geassocieerd was met de voortplanting in gevangenschap, maar een studie van Garnier *et al.* (2002) van wilde zwarte neushoorns toont aan dat het fenomeen ook bij wilde populaties optreedt.

Bij neushoorns in gevangenschap wordt EED geassocieerd met endometritis (Radcliffe *et al.*, 1997) en pyometra (Patton *et al.*, 1999). Deze associatie wordt ook gezien bij Equidae, waarbij eveneens een relatie wordt gezien met de leeftijd. Intra-uterien vocht en EED worden vaker gerapporteerd bij oudere merries. Dit is waarschijnlijk ook het geval bij neushoorns.

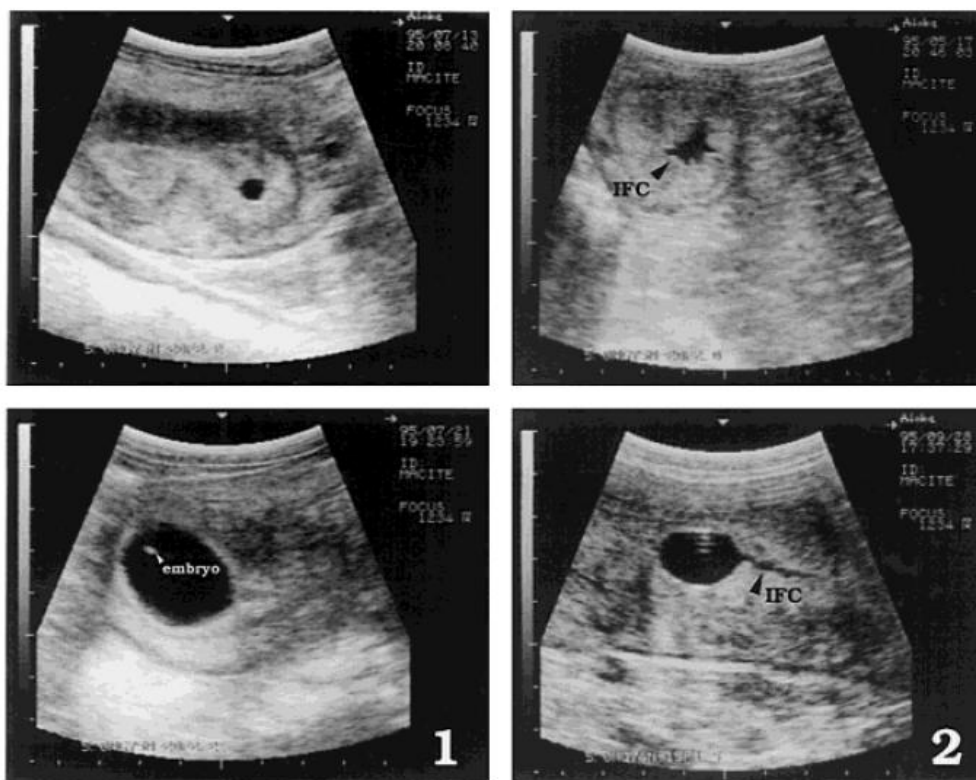


Fig. 12: Linksbovenaan: een vruchtblaasje op D15; Linksonderaan: hetzelfde vruchtblaasje op D23 met het embryo. Rechtsbovenaan: vaststelling van intrauterine vocht op D24 van de oestruscycus (IFC = Intrauterine Fluid Collection); Rechtsonderaan: vocht dat een 19-dagen oud vruchtblaasje omgeeft en zal leiden tot vroeg-embryonale sterfte. De assen zijn ingedeeld in intervallen van 1 cm. (Radcliffe *et al.*, 1997)

Tijdens een studie van Radcliffe *et al.* (1997) vond er bij een 33-jarige vrouwelijke witte neushoorn, tweemaal vroeg-embryonale sterfte (EED) plaats. Dit werd bevestigd door het verdwijnen van het vruchtblaasje en het embryo zelf bij echografisch onderzoek op D28. De aanwezigheid van

anechogeen intra-uterien vocht deed het vermoeden van een endometritis als oorzaak ontstaan (figuur 12). Radcliffe *et al.* (1997) veronderstelden dat dit vocht een ontstekingsvloeistof was als reactie op een uteriene irritatie. Net zoals bij Equidae is bij neushoorns een gezonde uteriene omgeving essentieel voor het behoud van het embryo voor D28.

Luteale insufficiëntie wordt ook gesuggereerd als oorzaak voor het niet behouden van een dracht tijdens de vroeg-embryonale fase. De corpora lutea op ovaria van oudere dieren zouden minder gemakkelijk een dracht kunnen houden en onderhouden door onvoldoende progesteronproductie. Schaffer en Bryant (2001) en Roth (2002) tonen aan dat progesteronsupplementatie steeds weerkerende drachtverliezen bij de zwarte en Sumatraanse neushoorns voorkomt. Een wetenschappelijk bewijs voor een tekort aan progesteron is er nog niet (Roth, 2006).

5. Andere mogelijke oorzaken van de lage reproductiviteit in gevangenschap

Men spreekt vaak over 'reproductive aging' maar er stellen zich problemen in alle leeftijdscategorieën. Hieronder volgt een bespreking van andere mogelijke oorzaken van de lage reproductiviteit van neushoorns in gevangenschap.

5.1. Gedrag en huisvesting

Studies hebben aangetoond dat sociale interacties tussen neushoorns in gevangenschap, voornamelijk een verhoogd agonistisch gedrag, een significante rol kunnen hebben op de reproductie (Cinkova en Bicik, 2013).

Cinkova en Bicik (2013) beschrijven ook dat de volwassen mannelijke witte neushoorns in het wild territoriaal zijn, terwijl de vrouwelijke dieren, subadulten en jongen in overlappende gebieden leven. Dit doen ze meestal in groepjes van twee tot drie dieren waarbij de groepen niet constant zijn. Twee dieren blijven meestal slechts maximum een maand in elkaars gezelschap. Het gebied waarin vrouwelijke dieren leven kan soms het territorium van zes tot zeven mannetjes omvatten.

In sterk contrast hiermee staat de situatie in gevangenschap. Vaak worden witte neushoorns in dierentuinen gedurende verschillende jaren in eenzelfde groep gehouden.

Essentieel bij het houden van neushoorns, is dat de neushoorns in voldoende grote gebieden worden gehouden met minstens één mannelijk dier en verschillende vrouwelijke dieren. Partnerkeuze is volgens Patton *et al.* (1999) zeer belangrijk opdat de dieren zouden voortplanten in gevangenschap. Hoe meer de omgeving de situatie in het wild benadert, hoe beter de voortplantingsresultaten.

Een goede samenstelling van de groep, alsook veranderingen in sociale structuur van de kuddes, zouden de kans op voortplanting kunnen vergroten. Hieromtrent werden reeds studies uitgevoerd door onder andere Pienaar (1994), Metrione *et al.* (2007) en Cinková en Bicik (2013), maar wat de ideale structuur is in gevangenschap moet nog verder onderzocht worden.

5.2. Stress

De onderdrukking van het voortplantingsapparaat zou mede veroorzaakt kunnen worden door de stress die ontstaat bij het leven in gevangenschap (Swaigood *et al.*, 2006). Volgens Carlstead en Brown (2005) is het vooral chronische stress die nefast inwerkt op de reproductieve fysiologie en het paargedrag. Wel stellen ze ook dat een beetje acute stress voordelig kan zijn voor de reproductie doordat het dier dan aandachtig blijft en reageert op socio-seksuele stimuli, zoals toenadering van de stier wat gepaard gaat met specifieke geuren en geluiden.

Carlstead en Brown (2005) hebben de relatie tussen de concentratie aan corticosteroïden uit feces en de problemen bij het houden en voortplanten van neushoorns in gevangenschap onderzocht. Hieruit bleek dat een verhoogde variabiliteit in de activiteit van de bijnier een indicator is voor chronische stress, wat bij de witte neushoorn gepaard gaat met acycliciteit. Daarnaast vertoonden de dieren ook meer stereotiep gedrag en een gedaalde olfactorische activiteit. Dit laatste zorgt ervoor dat vrouwelijke neushoorns minder prikkels opvangen die de ovariële activiteit stimuleren.

5.3. Voeding

Om na te gaan waarom de dieren in gevangenschap zo moeilijk voortplanten, wordt ook de voeding van de neushoorns in dierenparken geanalyseerd.

Witte neushoorns zijn grazers en halen hun energie uit de fermentatie van vezelig plantenmateriaal. Ze zijn monogastrisch en hebben een verteringssysteem dat gelijkaardig is aan dat van paarden, dus de vertering vindt vooral plaats in de dikke darm (Clauss en Hatt, 2006).

Het probleem met neushoorns in gevangenschap is dat ze vaak teveel gesupplementeerd worden met energierijk voeder en met mineralen. Neushoorns zijn gevoelig aan obesitas, daarom moet energierijke voeding beperkt worden (Clauss en Hatt, 2006, Berkeley *et al.*, 2010). Een overmatig gehalte aan glucose zou een rol kunnen spelen in de pathogenese van ziekten en reproductieve afwijkingen bij neushoorns in gevangenschap.

Bij Ruminantia gaat veel aandacht uit naar uitgebalanceerde voeding en een goede body condition score (BCS) pre- en postpartum. Een te glucoserijke voeding, kan de energiestatus en dus de ovariële activiteit in de vroege postpartum periode verbeteren, maar de kwaliteit van de oöcyte en het embryo lijden onder dergelijk insulinogeen dieet. Dit vormt een mogelijke verklaring voor het hoge percentage aan vroeg-embryonale sterfte. Een hoge concentratie aan vet heeft eveneens een tweezijdig effect. Het verbetert enerzijds de steroïdhormoon productie uit cholesterol, maar anderzijds krijgen de oöcyte en het embryo het zwaar te verduren door de overmatige vetopslag (Leroy *et al.*, 2008).

Recentelijk deed Versteeg (2011) onderzoek naar het definiëren van een BCS bij neushoorns. Ook bij deze diersoort zal het, onder andere voor de reproductie, belangrijk zijn een goede BCS te hebben en te behouden.

De meest belangrijke component in de voeding van neushoorns (en paarden) is ruwvoer. Het bijvoederen van commerciële graanproducten, welke een bron zijn van glucose en omega 6 vetzuren, wordt afgeraden.

Clauss *et al.* (2007) hebben een studie uitgevoerd naar het vetzuurpatroon in plasma/serum van zwarte neushoorns, zowel in gevangenschap als in het wild. Hieruit bleek dat neushoorns in gevangenschap hogere hoeveelheden aan poly-onverzadigde vetzuren (PUFA's) bevatten in vergelijking met wilde dieren. Deze hoge gehalten aan PUFA's zijn vooral te wijten aan het linolzuur (LA) ($\omega 6$), α -linoleenzuur ($\omega 3$) was dan weer in lagere concentraties aanwezig.

Volgens Wathes *et al.* (2007) kunnen PUFA's verschillende reproductieprocessen beïnvloeden, zowel bij mensen als bij dieren. De $\omega 3$ en $\omega 6$ vetzuren zouden bijvoorbeeld direct of indirect (via prostaglandines) verschillende effecten uitoefenen op ovariële steroïdhormoon synthese.

Naast glucose en vetzuren, gaat ook veel aandacht uit naar fyto-oestrogenen. Deze worden geproduceerd door planten als soya en alfalfa en worden vaak gevoederd in dierenparken. Door het dier worden ze aanzien als natuurlijk oestrogeen en activeren daardoor receptoren die de oestrogeenfunctie reguleren. Onderzoekers hebben aangetoond dat de oestrogeenreceptoren van witte neushoorns meer geactiveerd worden door fyto-oestrogenen dan deze van Indische neushoorns (Tubbs *et al.*, 2012). Ander onderzoek toont aan dat deze plantaardige oestrogenen verschillende nadelige effecten hebben op de reproductie bij vrouwelijke dieren, zoals een afwijkende cyclus of subfertiliteit (Patisaul, 2013). Of ze nu echt een gedeeltelijke verklaring vormen voor de reproductieve problemen bij witte neushoorns, moet nog verder onderzocht worden.

5.4. F₁ versus F₀

Het is opmerkelijk dat het vooral de dieren zijn die in gevangenschap geboren worden (F₁), die moeilijk voortplanten (Emslie en Brooks, 1999). Er zijn reeds verschillende hypothesen vooropgesteld die dit probleem proberen te verklaren. Sommige wetenschappers geloven dat de in gevangenschap geboren F₁-generatie socio-seksueel onderdrukt wordt door de oudere, uit het wild gehaalde F₀ vrouwtjes (Carlstead en Brown, 2005). Er zijn echter geen gegevens die deze bewering ondersteunen.

Swaigood *et al.* (2006) hebben verschillende veronderstellingen getest om een verklaring te vinden voor de slechte voortplantingsresultaten van de in gevangenschap geboren F₁-generatie. Dit hebben ze gedaan door F₁ en F₀ dieren op enkele gebieden te vergelijken. Als eerste werden er observationele studies uitgevoerd en werd nagegaan of F₀ vrouwtjes meer socio-seksueel gedrag vertonen tegenover mannelijke dieren dan F₁ vrouwtjes. Deze hypothese werd op basis van de resultaten die ze verkregen, niet ondersteund. Ook de hypothese die vooropstelt dat de mannelijke neushoorns socio-seksuele voorkeuren vertonen voor de F₀ vrouwelijke dieren boven de F₁ vrouwtjes, werd niet in de resultaten teruggevonden. Het paargedrag van de F₁ generatie werd eveneens in vraag gesteld, maar ook hierbij werd geen significant verschil vastgesteld.

Een hypothese die wel ondersteund werd was het verschil in het behouden van de dracht. In de studie vonden er vijf dekkingen plaats bij F₁ vrouwelijke neushoorns en vier bij de F₀-generatie. Slechts één van de vijf vrouwelijke F₁ neushoorns slaagde erin de dracht te voldragen. Bij de vier F₀ vrouwtjes daarentegen werden 3 nakomelingen geproduceerd. In welk stadium van de dracht verworpen werd, staat niet vermeld. Aan de hand van deze resultaten stellen Swaigood *et al.* (2006) dat het voornamelijk in de periode na het dekken is dat de reproductie faalt. Dit gaat in tegen eerdere

bevindingen waarbij gesteld wordt dat ook verschillende factoren vóór de copulatie het falen van de reproductie in de hand kunnen werken.

6. Geassisteerde voortplantingstechnieken

De vele problemen bij de voortplanting van neushoorns in gevangenschap doen de nood aan geassisteerde voortplantingstechnieken stijgen. Hermes *et al.* (2006) hebben aangetoond dat 60% van de overblijvende populatie vrouwelijke noordelijke witte neushoorns in gevangenschap infertiel is. Tevens zou er zonder geassisteerde reproductie technologieën (ARTs) teveel gefokt worden met verwante dieren.

Bij mensen, kleine huisdieren en merries worden deze technieken regelmatig toegepast; het gebruik bij neushoorns daarentegen kent een aantal moeilijkheden.

Het dikke integument bijvoorbeeld en de ruime thorax bemoeilijken de klassieke en directe laparoscopische benadering van de ovaria. De lengte van de geslachtstractus en de onmogelijkheid om het ovarium manueel te fixeren belemmeren transvaginale ovum pick-up (OPU, zie verder).

Het zoeken van technieken om deze obstakels te overwinnen, moet ervoor zorgen dat er leefbare en gezonde nakomelingen met een zo groot mogelijke genetische diversiteit verkregen worden. Bovendien is, zoals eerder aangehaald, het tijdig drachtig krijgen van jonge dieren zeer belangrijk als profylaxie van reproductieve stoornissen (Hermes *et al.*, 2004, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2006).

6.1. Oestrus en ovulatie inductie

Omdat anoestrus in de witte neushoorn aanzien wordt als een primaire oorzaak van de lage reproductiviteit, werden meerdere protocols opgesteld om de bronst hormonaal te induceren.

Verschillende combinaties van synthetisch progesteron, soms voorafgegaan door PGF_{2α} en/of gevolgd door combinaties van FSH, PMSG, hCG en GnRH, werden reeds gebruikt. Tot nu toe zijn er slechts twee protocols beschreven waarmee men erin slaagde de oestrus in anovulatoire witte neushoorns te synchroniseren. Het eerste protocol bestaat uit het toedienen van chloormadinon acetaat (CMA) als synthetisch progestine, gecombineerd met hCG. Bijna 20 jaar geleden publiceerden Walzer en Schwarzenberger (1995) reeds een artikel waarin ze het gebruik van CMA beschreven bij een anovulatoire vrouwelijke witte neushoorn. Meer dan twee jaar volgden ze het dier op met behulp van progestageenmetingen in feces. Er werden steeds lage progestageenconcentraties gemeten. In een poging om hier verandering in te brengen, werd CMA 1,5 maand lang toegediend, gevolgd door een hCG injectie. De dosis en het behandelingsinterval werden allometrisch afgeleid van het gebruik van deze middelen bij de merrie. Tijdens en na de behandeling werden de progestageenconcentraties nog steeds opgevolgd. Deze bleven laag tot 10 dagen na de hCG injectie. De stijging wees op luteale activiteit. De luteale fase duurde ongeveer 20 dagen. Zo'n 70 dagen na de hCG injectie werd bronstgedrag geobserveerd dat 48h duurde. Hoewel er geen blijvende cycliciteit verkregen werd, toonde de studie wel aan dat het mogelijk was om luteale activiteit te induceren bij witte neushoorns.

Echter, een recente studie evalueerde de effectiviteit van dit protocol via de behandeling van 10 dieren. Uit deze studie bleek dat 80% van de vrouwelijke dieren een pre-ovulatoire follikel ontwikkelde, waarvan slechts 30% een verhoogde luteale activiteit vertoonde, hetgeen een indicatie is voor ovulatie. Het doel om een regelmatige bronstcyclus te verkrijgen werd niet bereikt (Schwarzenberger

et al., 1998; Hermes *et al.*, 2006). Mogelijke oorzaken van de lage respons en het niet-blijvende effect bij het toepassen van dit protocol zijn het behandelen van oudere vrouwelijke dieren met inactieve ovaria (premature veroudering) of het onderschatte belang van gedrags- en hiërarchieinvloeden op de reproductieve activiteit van de vrouwelijke dieren.

Meer belovend is het gebruik van het synthetische GnRH-analoog desloreline acetaat om ovulatie te induceren en te plannen bij het gebruik van KI bij jonge, anoestriscche witte neushoorns met folliculaire activiteit. Dit protocol vereist een goede endocriene opvolging van de dieren en echografische monitoring. Naar analogie met de merrie, waarbij synthetische GnRH-analogen gebruikt worden om een ovulatie te induceren of te versnellen tijdens de transitieperiode of tijdens het voortplantingsseizoen, wordt desloreline toegediend wanneer met echografie een pre-ovulatoire follikel zichtbaar is. De resultaten zijn veelbelovend. Volgens een artikel van Hermes *et al.* (2007) trad er ovulatie op bij 80% van de dieren en werd dracht bekomen bij 40% (door gebruik te maken van KI).

6.2. Ovariële superstimulatie

Bij de merrie kan equine FSH gebruikt worden om de ovariële activiteit te stimuleren. Hierbij stijgt het aantal ovulaties, maar vermindert de kwaliteit van de embryo's (Vandenberghe *et al.*, 2012). Bij de neushoorn is het gebruik van eFSH niet aan te raden, vermits het tweemaal per dag gedurende vijf dagen toegediend moet worden. Dit veroorzaakt onnodige stress en trauma bij de dieren. Beter is het om gebruik te maken van deslorelinepreparaten met vertraagde afgifte.

In een studie van Hermes *et al.* (2009) werd een behandeling met dit GnRH-analoog ingesteld bij 11 vrouwelijke dieren in anoestrus. Desloreline werd toegediend op dag 0, 2 en 4 met behulp van een pijl. De ovariële activiteit werd geëvalueerd met echografie vóór de behandeling en op dag 6 of 7 van de behandeling. Hierbij werd een continue stijging in de grootte van de follikels en het aantal follikels vastgesteld. Er was een significant verschil in folliculaire ontwikkeling tussen behandelde dieren en niet-behandelde dieren (n = 16) (Tabel 3).

Species	Aantal follikels $\geq 5\text{mm}/\text{ovarium}$	Grootte van de meest omvangrijke follikel/ovarium
Witte neushoorn		
- Anoestrus (n = 10)	$3,1 \pm 0,4^a$	$12,9 \pm 1,8^a$
- Gesuperstimuleerd (n = 4)	$16,5 \pm 2,2^b$	$26,8 \pm 1,6^b$
Zwarte neushoorn		
- Anoestrus (n = 6)	$4,9 \pm 0,7^c$	$16,3 \pm 2,6^c$
- Gesuperstimuleerd (n = 7)	$13,7 \pm 0,6^d$	$31,0 \pm 0,7^d$

^{a-d} Waarden binnen een kolom en species met een verschillend superscript zijn significant verschillend.

Tabel 3: Aantal follikels en de grootte van de follikels bij witte en zwarte neushoorns in anoestrus en bij superstimulatie (Hermes *et al.*, 2009).

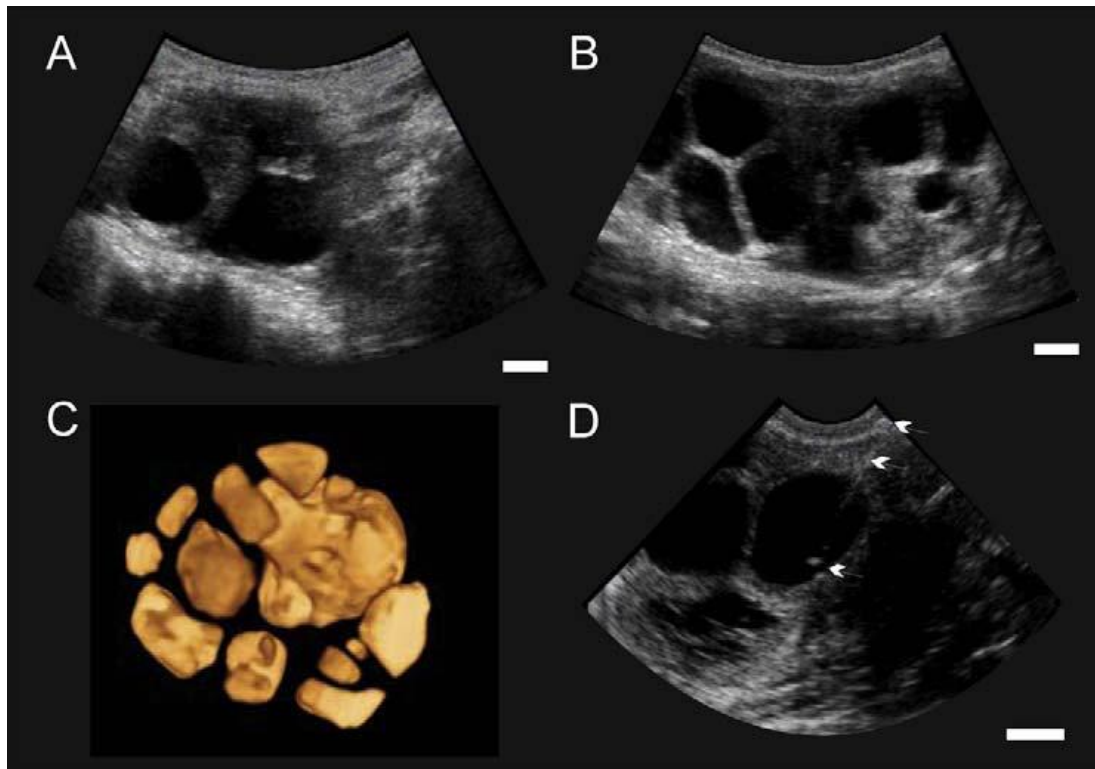


Fig. 13: Echobeelden van gesuperovuleerde zwarte neushoorns en van zwarte neushoorns in anoestrus. (A) Ovarium in anoestrus met twee grote follikels. (B) Ovarium met verschillende grote follikels na stimulatie met een GnRH-analoog. (C) Inverse 3D echo-reconstructie van het ovarium. De gekleurde gebieden geven met vocht gevulde follikels weer. (D) Aspiratienaald in het folliculair lumen (pijlen) na penetratie van de rectumwand en ovarieel weefsel. (Hermes *et al.*, 2009)

Bij negen vrouwelijke dieren die gesuperstimuleerd werden, werd ook de progesteronconcentratie in de feces gemeten. Zeven hiervan hadden een gestegen progesteronconcentratie wat aantoont dat de superstimulatie gevolgd werd door een ovulatie.

6.3. OPU

De ontwikkeling van Ovum Pick-Up (OPU) is een noodzakelijke tussenstap voor de *in vitro* embryoproductie. Volgens Hermes *et al.* (2009) kunnen follikels het beste gecollecteerd worden bij neushoorns door gebruik te maken van transrectale echobegeleide follikel aspiratie. Via de transvaginale benadering, die ook gebruikt wordt bij Ruminantia en Equidae, kan men de ovaria bij zwarte en witte neushoorns niet bereiken (Hildebrandt *et al.*, 2007).

Bij de zwarte neushoorns, waar OPU uitgevoerd werd in een sternale positie (Hermes *et al.*, 2009), waren beide ovaria goed bereikbaar. Bij de witte neushoorn daarentegen was dit niet zo eenvoudig vermits de afmetingen van het voortplantingsstelsel groter zijn en het linker ovarium meer craniaal gelegen is.

Volgens het protocol van Hermes *et al.* (2009) werden de follikels geaspireerd op D6-7 van de behandeling met het GnRH-analoog, desloreline. Dit gebeurde met een 100 cm lang verlengstuk waarop zich een 14-gauge naald bevond en waarin een micro-convexe sonde geïntegreerd was. Na echografische visualisatie van het ovarium werd de naald doorheen de rectumwand in de follikel

ingebracht en werd het follikelvocht geaspireerd en geflushd. Na filtering van het aspiraats werden de cumulus oöcyte complexen (COC's) verkregen. Gemiddeld werden er twee tot negen COC's verkregen per collectie (tabel 4). Postoperatief werden er geen complicaties vastgesteld.

Species	Individual no.	OPU attempts	Follicles >10 mm/ovary	Follicles aspirated/OPU	COCs with compact cumulus	COCs with expanded cumulus	Denuded oocytes
White rhinoceros	1	1	16.5	10	5	–	–
Black rhinoceros	1	3	13.1 ± 0.74	23.0 ± 2.0	13	1	–
	2	2	15.3 ± 0.85	22.5 ± 1.5	9	–	1

Tabel 4: Resultaten van een oöcyte collectie bij een witte en twee zwarte neushoorns (Hermes *et al.*, 2009)

6.4. IVM en IVF

In de studie van Hermes *et al.* (2009) werden alle COC's waarbij nog geen expansie had plaatsgevonden, als immatuur geklasseerd en in een maturatiemedium geplaatst (IVM = *in vitro* maturatie). Na de maturatie werden overtollige cumuluscellen verwijderd en werden de COC's met sperma geïncubeerd (IVF = *in vitro* fertilisatie).

Het volledig beschrijven van de exacte omstandigheden en werkwijze zou ons hier te ver leiden, maar Hermes *et al.* (2009) rapporteerden hiermee het eerste neushoornembryo dat ooit *in vitro* geproduceerd werd en illustreerden zo de mogelijkheid om via transrectale, echobegeleide follikel aspiratie *in vitro* embryos te produceren van anders infertiele dieren.

6.5. ICSI

Na maturatie kunnen de cumuluscellen ook verwijderd worden en kan er een intracytoplasmatische sperma injectie (ICSI) plaatsvinden. Hierbij wordt een spermatozoïde (van een donorstier) geselecteerd en in een oöcyte (van een donorkoe) geïnjecteerd. Het embryo (in blastocyststadium) dat hieruit ontstaat ontwikkelt zich voor ongeveer een week in laboratoriumomstandigheden en kan daarna in een receptorkoe ingebracht worden zoals bij een standaard embryotransplantatie (Hermes *et al.*, 2009).

6.6. KI

Het probleem van het asymmetrisch verouderingsproces kan onder andere voorkomen worden door het toepassen van kunstmatige inseminatie (KI). Deze techniek kan gebruikt worden wanneer natuurlijke dekking niet mogelijk is of wanneer de tussenkaltijd te lang is. De tussenkaltijd varieert van 1,5 tot 3,45 jaar (Bertschinger, 1994; Owen-Smith, 1998; Hildebrandt *et al.*, 2007).

Daarenboven kan KI de genetische diversiteit verrijken door gebruik te maken van sperma (vers of diepvries) van mannelijke dieren uit verschillende populaties, zelfs van populaties die in het wild leven (Godfrey *et al.*, 1991; Hildebrandt *et al.*, 2007).

Een voorwaarde voor het toepassen van KI is echter dat de vrouwelijke dieren een gezond voortplantingsstelsel moeten hebben. Jammer genoeg zijn er veel vrouwelijke neushoorns die in gevangenschap leven met pathologische veranderingen aan vagina, cervix, uterus, of oviduct en

kunnen zich daardoor onmogelijk voortplanten. Als laatste redmiddel om het verlies van genetische diversiteit en het uitsterven van species tegen te gaan, kan men met behulp van bovenstaande technieken (IVM, IVF, ICSI) trachten met de oöcyten, en dus het genetische materiaal, van deze infertiele dieren verder te gaan (Hermes *et al.*, 2009).

Hildebrandt *et al.* rapporteerden in 2007 de eerste succesvol uitgevoerde KI bij een 24-jarige nullipare, onregelmatig cyclerende witte neushoorn. Deze werd met behulp van echografie opgevolgd, vermits een juiste voorspelling van het tijdstip van ovulatie cruciaal is voor het succes van de KI. Wanneer een pre-ovulatoire follikel aanwezig was, werd de ovulatie geïnduceerd door gebruik te maken van een GnRH-analoog (OvuplantTM) op de dag van de inseminatie. Net zoals bij de merrie zorgde deze GnRH-agonist ook bij de witte neushoorn voor een ovulatie binnen de 48h, wanneer een pre-ovulatoire follikel aanwezig was. Dit werd aangetoond door progesteron in serum te bepalen.

De inseminatie zelf werd uitgevoerd met behulp van een speciale katheter. Deze moet zo ontworpen zijn dat het hymen en de stevige cervicale plooien overwonnen kunnen worden. Het materiaal moet flexibel genoeg zijn om hoeken van 90° te kunnen maken en de punt moet glad en rond zijn om weefselperforatie te voorkomen.

De katheter werd vaginaal ingebracht en met behulp van (intravaginale) manuele palpatie doorheen de vaginale opening in het hymen geloodst. Vervolgens werd de cervix transrectaal gepalpeerd en manueel gefixeerd zodat de katheter doorheen de cervicale plooien gemanoeuvreerd kon worden. Hiervoor was een voortdurend voorwaartse druk nodig en het continu draaien van de katheter die in een hoek van 45-60° gebogen was. De tip van de katheter werd in de uteriene hoorn waarin de pre-ovulatoire follikel aanwezig was, geplaatst. Transrectale echografie kon de juiste positionering van de katheter verifiëren.

BESPREKING

De ontwikkeling van technieken en protocols om de reproductieve status van neushoorns beter in beeld te kunnen brengen, zorgt voor een steeds beter wordend inzicht in de voortplanting van deze dieren. Desondanks blijven sommige zaken, zoals de cycluslengte van witte neushoorns, onduidelijk. Patton *et al.* (1999) bespreken het bestaan van type I en type II cycli, terwijl andere onderzoekers eerder van mening zijn dat de normale cycluslengte 30-35 dagen bedraagt en dat cycli van 70 dagen het gevolg zijn van vroeg-embryonale sterfte. Een vergelijkbaar fenomeen komt voor bij merries. Een verlengde cyclus bij een merrie die gedekt werd, wordt in veel gevallen veroorzaakt door vroeg-embryonale of foetale sterfte (Brinsko *et al.*, 2011).

Bij witte neushoorns in het wild wordt ook een cycluslengte van ongeveer 30 dagen geobserveerd (Owen-Smith, 1998) en vermits bij deze dieren slechts weinig voortplantingsproblemen voorkomen, lijkt het me waarschijnlijk dat dit de normale duur is van een cyclus bij de witte neushoorn. Het observeren van een cyclus van 70 dagen kan ook het gevolg zijn van het simpelweg missen van een bronst.

Bij neushoorns in gevangenschap worden talrijke afwijkende en zelfs afwezige cycluspatronen gezien. Er wordt volop onderzoek gedaan naar mechanismen die deze abnormaliteiten veroorzaken en naar maatregelen die genomen kunnen worden om ze te voorkomen. Volgens Hermes *et al.* (2004, 2006) is het belangrijk om ervoor te zorgen dat de neushoorns zich vóór een leeftijd van 16 jaar, en liefst tussen de zes en de negen jaar, voor de eerste maal hebben voortgeplant. Dit zou de incidentie van reproductieve pathologieën sterk doen dalen. Het beste zou zijn dat de neushoorns zich doorheen hun hele leven op een regelmatige basis voortplanten en zo niet continu onder oestrogene invloed zijn. Continue folliculaire golven zonder daaropvolgende dracht, zorgen voor het opraken van de folliculaire stock in de ovaria, wat uiteindelijk leidt tot infertiliteit.

Een verminderde fertiliteit bij het ouder worden is normaal, denk maar aan de menopauze bij de mens, maar bij witte neushoorns in gevangenschap treedt dit 'reproductive aging' proces 10-15 jaar vroeger op dan wat verwacht wordt bij een normaal reproductief dier.

Geassisteerde voortplantingstechnieken (ARTs, zoals oestrus/ovulatie inductie, kunstmatige inseminatie, *in vitro* fertilisatie) bieden verschillende mogelijkheden om de reproductie in neushoorns te vergemakkelijken en om het genetisch potentieel te vergroten. Theoretisch klinkt dit heel mooi, het verwezenlijken daarentegen is iets heel anders. Een eerste moeilijkheid is de grootte van het dier en de moeilijke bereikbaarheid van het voortplantingsstelsel. Bovendien is er steeds sedatie en/of anesthesie nodig om de technieken toe te kunnen passen.

Er zijn reeds enkele ARTs succesvol toegepast, maar nog niet op grote schaal. Verdere uitwerking van hormonale protocols en het ontwikkelen van aangepast materiaal zullen er in de toekomst voor zorgen dat de technieken meer en beter toegepast kunnen worden.

Dergelijke ARTs zijn zeker bruikbaar en kunnen een redmiddel vormen voor het doorgeven van genen van anders infertiele dieren, maar ze vormen geen oplossing voor het oorzakelijk probleem. De

voortplantingsproblematiek bij de witte neushoorn in gevangenschap is multifactorieel. Het belang van gedragspatronen, een goede omgeving en sociale interacties worden vaak onderschat, maar zijn zeer belangrijk in het hele voortplantingsproces.

Het observeren van neushoorns in het wild kan veel informatie geven omtrent de reproductieve gewoonten van deze dieren. Als men erin zou slagen het management zo aan te passen dat de dieren in gevangenschap zich gedragen zoals deze in het wild, zijn de meer invasieve reproductietechnieken misschien minder noodzakelijk.

Veel tijd voor observaties en dergelijke is er jammer genoeg niet. De stroperij viert hoogtij en er zullen snel acties ondernomen moeten worden om het uitsterven van neushoornsoorten te voorkomen.

Opmerking: Wat uiteraard niet vergeten mag worden is dat in deze uiteenzetting enkel de vrouwelijke kant van het hele verhaal besproken wordt. Uiteraard zijn spermakwaliteit en andere mannelijke factoren eveneens van groot (en misschien wel onderschat) belang.

Referentielijst

- Berkeley E.V., Kirkpatrick J.F., Schaffer N.E., Bryant W.M., Threlfall W.R. (1997). Serum and Fecal Steroid Analysis of Ovulation, Pregnancy, and Parturition in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Zoo Biology* 16, 121-132.
- Berkeley E.V., Linklater W.L., Dierenfeld E.S. (2010). Dietary impact on circulating glucose profiles in the white rhinoceros. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95 (2), 245-251.
- Bertschinger H.J. (1994). Reproduction in black and white rhinos: a review. In: Penzhorn B.L., Kriek N.P.J. (editors). Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", p. 155–161.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D. (2011). *Manual of Equine Reproduction*. Third Edition. Elsevier, p. 10-18; 61-62.
- Brown J. L., Bellem A. C., Fouraker M., Wildt D. E., Roth T. L. (2001). Comparative analysis of gonadal and adrenal activity in the black and white rhinoceros in North American by noninvasive endocrine monitoring. *Zoo Biology* 20, 463–485.
- Carlstead K., Brown J. L. (2005). Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology* 24, 215–232.
- Carter A.M., Enders A.C. (2013). The Evolution of Epitheliochorial Placentation. *Annual Review of Animal Biosciences* 1, 443-467.
- Carter L., Stephens S., Gould M., Morrow C. (2007). Reproductive monitoring in captive southern white rhinoceros: vulval swellings as an indicator of oestrus . Australian Regional Association of Zoological Parks and Aquaria Conference Proceedings, 1-8.
- Cinková I., Bicik V. (2013). Social and reproductive behaviour of critically endangered northern white rhinoceros in a zoological garden. *Mammalian Biology* 78, 50-54.
- Clauss M., Dierenfeld E.S., Bigley K.E., Wang Y., Ghebremeskel K., Hatt J.-M., Flach E.J., Behlert O., Castell J.C., Streich W.J., Bauer J.E. (2007). Fatty acid status in captive and free-ranging black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92, 231-241.
- Clauss M., Hatt J.-M. (2006). The feeding of rhinoceros in captivity. *International Zoo Yearbook* 40, 197-209.
- Emslie R.H., Amin R., Kock R. (2009). Guidelines for the *in situ* Re-introduction and Translocation of African and Asian rhinoceros. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission 39, p. 1-115.
- Emslie R.H., Brooks M. (1999). African rhino: status survey and conservation action plan. Gland and Cambridge, IUCN/ SSC African Rhino Specialist Group, p. 1-92.
- Garnier J. N., Holt W. V., Watson, P. F. (2002). Non-invasive assessment of oestrous cycles and evaluation of reproductive seasonality in the female wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*). *Reproduction* 123, 877–889.

Godfrey R. W., Pope C. E., Dresser B. L., Olsen J. H. (1991). Gross anatomy of the reproductive tract of female black (*Diceros bicornis michaeli*) and white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Zoo Biology* 10, 165–175.

Goot, van der A.C. (2009). An analysis on cyclicity and pregnancy in the Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) by noninvasive progesterone monitoring using VHF radio telemetry. Master Thesis for the University of Utrecht and the Institute for Breeding Rare and Endangered African Mammals (IBREAM), p. 1-14.

Goot, van der A.C., Dalerum F., Ganswind A., Martin G.b., Millar R.P., Paris M.C.J. (2013). Faecal progestagen profiles in wild southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *African Zoology* 48 (1), 143-151.

Hermes R., Göritz F., Portas T.J., Bryant B.R., Kelly J.M., Maclellan L.J., Keeley T., Schwarzenberger F., Walzer C., Schnorrenberg A., Spindler R.E., Saragusty J., Kaandorp S., Hildebrandt T.B. (2009). Ovarian superstimulation, transrectal ultrasound-guided oocyte recovery, and IVF in rhinoceros. *Theriogenology* 72, 959-968.

Hermes R., Göritz F., Streich W.J., Hildebrandt T.B. (2007). Assisted Reproduction in Female Rhinoceros and Elephants – Current Status and Future Perspective. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 33–44.

Hermes R., Hildebrandt T. B., Göritz F. (2004). Reproductive problems directly attributable to long-term captivity-asymmetric reproductive aging. *Animal Reproductive Science* 82–83, 49–60.

Hermes R., Hildebrandt T. B., Walzer C., Göritz F., Gray C., Niemuller C., Schwarzenberger F. (2012). Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Theriogenology* 78, 1217–1223.

Hermes R., Hildebrandt T.B., Walzer C., Göritz F., Patton M.L., Silinski S., Anderson M.J., Reid C.E., Wibbelt G., Tomasova K., Schwarzenberger F. (2006). The effect of long non-reproductive periods on the genital health in captive female white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, C.s. cottoni). *Theriogenology* 65, 1492–1515.

Hildebrandt T.B., Hermes R., Walzer C., Sós E., Molnar V., Mezösi L., Schnorrenberg A., Silinski S., Streich J., Schwarzenberger F., Göritz F. (2007). Artificial insemination in the anoestrus and the postpartum white rhinoceros using GnRH analogue to induce ovulation. *Theriogenology* 67, 1473-1484.

Hindle J. E., Hodges J. K. (1990). Metabolism of oestradiol-17 β and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Journal of Reproduction & Fertility* 90, 571–580.

Hindle J. E., Möstl E., Hodges J. K. (1992). Measurement of urinary oestrogens and 20 α -dihydroprogesterone during ovarian cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. *Journal of Reproduction & Fertility* 94, 237–249.

IRF (2013, 2014) International Rhino Foundation. Internetreferentie: www.rhinos.org/professional-resources (geconsulteerd in november 2013, januari 2014).

Leroy J., Van Soom A., Opsomer G., Goovaerts I., Bols P. (2008). Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (5), 623-632.

McFarlane J.R., Cabrera C.M., Coulson S.A., Papkoff H. (1991). Partial Purification and Characterisation of Rhinoceros Gonadotropins, Growth Hormone, and Prolactin: Comparison with the Horse and Sheep. *Biology of Reproduction* 44, 94-101.

Mettrione L.C., Harder J.D. (2011). Fecal corticosterone concentrations and reproductive success in captive female southern white rhinoceros. *General and Comparative Endocrinology* 171, 283-292.

Mettrione L.C., Penfold L.M., Waring G.H. (2007). Social and Spatial Relationships in Captive Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Zoo Biology* 26, 487-502.

Montali R. J., Citino S. B. (1993). Pathological findings in captive rhinoceroses. Proceedings of an International Conference Rhinoceros Biology and Conservatio, 346–349.

Morrow C., Kudeweh S., Goold M., Standley S. (2008). Reproductive cycles, pregnancy and reversal of long term acyclicity in captive southern white rhinoceros at Hamilton Zoo. *Reproduction Fertility and Development* 21 (1), 180.

Owen-Smith N.R. (1975). The social ethology of the white rhinoceros, *Ceratotherium simum* (Burchell, 1817). *Zeitschrift fur Tierpsychologie* 38(4), 341-351.

Owen-Smith R.N. (1998). Reproductive behaviour of white rhinoceros in the wild in Umfolozi Game Reserve, South Africa, p. 28-35.

Owen-Smith R.N. (2013). *Ceratotherium simum*, White rhinoceros. In: Kingdon J., Hoffmann M. (editors). *Mammals of Africa*, volume V: Carnivores, Pangolins, Equids and Rhinoceroses. London, Bloomsbury Publishing, p. 446-454.

Patisaul H.B. (2012). Infertility in the Southern White Rhino: Is Diet the Source of the Problem? *Endocrinology* 153(4), 1568-1571.

Patton M. L., Swaisgood R. R., Czekala N. M., White A. M., Fetter G. A., Montagne J. P., Rieches R. G., Lance V. A. (1999). Reproductive cycle length and pregnancy in the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observations of mating behavior. *Zoo Biology* 18, 111–127.

Pienaar D.J. (1994). Social organization and behavior of the white rhinoceros. Proceedings of a symposium on “Rhinos as Game Ranch Animals”. p. 87-92.

Radcliffe R. W., Czekala N. M., Osofsky S.A. (1997). Combined serial ultrasonography and fecal progestin analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*): preliminary results. *Zoo Biology* 16, 445–456.

Radcliffe R. W., Eyres A. I., Patton M. L., Czekala N. M., Emslie, R. H. (2001). Ultrasonographic characterization of ovarian events and fetal gestational parameters in two southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) and correlation to fecal progesterone. *Theriogenology* 55, 1033–1049.

Roth T. L., Bateman H. L., Kroll J. L., Steinetz B. G., Reinhart P. R. (2004). Endocrine and ultrasonographic characterization of a successful pregnancy in a Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) supplemented with a synthetic progestin. *Zoo Biology* 23, 219–238.

Roth T. L., O'Brien J. K., McRae M. A., Bellem A. C., Romo S. J., Kroll J. L., Brown, J. L. (2001). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian cycle and early pregnancy in the Sumatran rhinoceros, *Dicerorhinus sumatrensis*. *Reproduction* 121, 139–149.

Roth T.L. (2006). A review of the reproductive physiology of rhinoceros species in captivity. *International Zoo Yearbook* 40, 130-143.

Schaffer N.E., Foley G.L., Gill S., Pope C.E. (2001). Clinical implications of rhinoceros reproductive tract anatomy and histology. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 32(1), 31-46.

Schwarzenberger F., Brown J.L. (2013). Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria* 100, 209-225.

Schwarzenberger F., Walzer C., Tomasova K., Vahala J., Meister J., Goodrowe K. L., Zima J., Straub F., Lynch M. (1998). Fecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Animal Reproduction Science* 53, 173–190.

Sherman G.B., Lund L.A., Bunick D., Winn R.J. (1997). Characterization and phylogenetic significance of rhinoceros luteinizing hormone beta (LH β) subunit messenger RNA structure, complementary DNA sequence and gene copy number. *Gene* 195 (2), 131-139.

Stoops M.A., Pairan R.D., Roth T.L. (2004). Follicular, endocrine and behavioural dynamics of the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) oestrous cycle. *Reproduction* 128 (6), 843-856.

Strike T., Pickard A. (2000). Non-invasive hormone analysis for reproductive monitoring in female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Proceedings of the 2nd Annual Symposium on Zoo Research, Paignton Zoo*, p. 191-197.

Swaigood R. R., Dickman D. M., White A.M. (2006). A captive population in crisis: testing hypotheses for reproductive failure in captive-born southern white rhinoceros females. *Biological Conservation* 129, 468–476.

Tubbs C., Hartig P., Cardon M., Varga N., Milnes M. (2012). Activation of Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) Estrogen Receptors by Phytoestrogens: Potential Role in the Reproductive Failure of Captive-Born Females? *Endocrinology* 153(3), 1444-1452.

Vandenberghe L.T.M., Govaere J., Nelis H., Hoogewijs M., Daels P., Van Soom A. (2012). Embryotransplantatie bij het paard: onmisbaar in de moderne fokkerij. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 81, 274-282.

Versteeg L. (2011). Body condition scoring of captive white rhinoceros *Ceratotherium simum*. *Proceedings of the 2011 International Elephant and Rhino Conservation and Research Symposium, Rotterdam*, p. 1123-1137.

Wagner R.A. (1986). The reproductive cycle of one southern white rhinoceros. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, p. 14-16.

White A.M., Swaigood R., Czekala N (2007). Ranging patterns in white rhinoceros, *Ceratotherium simum simum*: implications for mating strategies. *Animal Behaviour* 74, 349-356.