

UNIVERSITEIT GENT  
FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013-2014

**DE ROL VAN DE MANNELIJKE NEUSHOORN  
IN DE VOORTPLANTINGSPROBLEMATIEK**

door

Margot VAN DE VELDE

Promotoren: Drs C. Ververs  
Drs J. Govaere

Casusbespreking in het kader  
van de masterproef

*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

---

Net zoals bij mijn eerste casus, wordt in mijn tweede casuïstiek geen dagdagelijks onderwerp besproken. Oorspronkelijk was het de bedoeling om een sperma-afname en kunstmatige inseminatie bij de neushoorn zelf bij te wonen, jammer genoeg kon dit wegens omstandigheden niet meer plaatsvinden voor de deadline. Ik vond het alvast enorm interessant om onderzoekwerk te doen over de voortplanting bij neushoorns en alles wat er mee te maken heeft. Hoewel ik er in het begin heel weinig van wist, leerde ik gaandeweg deze imposante diersoort beter kennen.

Voortplanting en verloskunde in het algemeen hebben me altijd al geïnteresseerd. Door het schrijven van deze casus stond ik veel meer stil bij het feit dat nog lang niet alles bekend is van alle diersoorten. Hoewel ik als practicus zou willen gaan werken, leek het me enorm boeiend om over dergelijke zaken verder onderzoek te doen.

Genoeg nu over mij en neushoorns, als afsluiter zou ik graag nog enkele mensen bedanken:

Dierenarts Cyriel Ververs, 'Hartelijk bedankt voor alle hulp en om tijd vrij te maken voor het nalezen van mijn werk. Uw gedrevenheid om meer te weten over de voortplantingsproblematiek bij deze dieren zorgde er onder andere voor dat ik steeds met veel enthousiasme aan deze masterproef verder werkte.'

Isabelle Van de Velde, 'Lieve zus, het is misschien iets groter dan een konijn, maar een neushoorn kan ook schattig zijn! Het is misschien niet je ding, maar een dikke merci voor al je belangstelling!'

Ook mijn welgemeende dank aan de rest van het gezin en aan vele vrienden voor al jullie steun. Niet alleen bij het schrijven van deze masterproef, maar vooral ook bij het doorlopen van deze studie!

# INHOUDSOPGAVE

---

VOORBLAD	
TITELBLAD	
VOORWOORD	
INHOUDSOPGAVE	
SAMENVATTING .....	1
1 Inleiding.....	2
1.1 Situering.....	2
1.2 Casuïstiek .....	2
2 Anatomie.....	3
2.1 Penis en preputium .....	3
2.2 Testikels.....	3
2.3 Secundaire geslachtsklieren.....	4
3 KI .....	5
3.1 Inleiding.....	5
3.2 Sperma-afname .....	6
▪ Manuele massage van de penis .....	6
▪ Rectale stimulatie van de secundaire geslachtsklieren .....	7
▪ Collecteren van sperma na dekking .....	7
▪ Epididymaal sperma .....	8
▪ Kunstvagina.....	9
▪ Electro-ejaculatie .....	10
3.3 Het belang van echografie.....	13
3.4 Evaluatie sperma .....	14
3.4.1 Opmerkingen:.....	15
▪ Volume .....	15
▪ Aantal spermacellen in een ejaculaat.....	16
▪ Motiliteit .....	16
▪ Sociale status .....	16
▪ Morfologie.....	17
▪ Rhinocerotidae >< Equidae.....	17
3.5 Bewaren sperma .....	18
3.5.1 Verdunner .....	18
3.5.2 Cryoprotectans.....	20
3.6 Verwerken sperma .....	21
3.6.1 Afkoelen .....	21
3.6.2 Invriezen .....	22
3.7 Gebruik van KI bij de neushoorn .....	23
3.7.1 Procedure vers sperma .....	23
3.7.2 Procedure diepvriessperma.....	24
4 Afwijkingen aan het ♂ voortplantingsstelsel.....	25
4.1 Penis.....	25
4.2 Secundaire geslachtsklieren.....	26
4.3 Testikels.....	26
BESPREKING .....	29
REFERENTIELIJST .....	32

## SAMENVATTING

---

De fertiliteit van mannelijke neushoorns werd tot op vandaag nog slechts door weinig onderzoekers geëvalueerd. Hermes et al. zijn pioniers op dit vlak en evalueerden de reproductiviteit van 21 mannelijke witte neushoorns in gevangenschap (2005). Ze toonden hierbij een duidelijke correlatie aan tussen het volume van de accessoire geslachtsklieren en de aantallen motiele en intacte spermatozoa. Dit veronderstelt dat een goede fertiliteit zowel goed ontwikkelde geslachtsklieren als een efficiënte spermatogenese vereist. Bovendien lijkt de fitness van een mannelijke neushoorn beïnvloed te worden door het aantal mannelijke dieren die in een groep aanwezig zijn en de sociale status van het dier binnenin die groep.

Een frequente bevinding bij oudere mannelijke neushoorns is interstitiële fibrose van de testikels. Deze fibrosering heeft echter geen nadelig effect op de fertiliteit (Hermes en Hildebrandt, 2011).

Een uitdaging om de spermakwaliteit van neushoorns te kunnen beoordelen, is het collecteren van het sperma. Verschillende methoden die ook gebruikt worden bij andere zoogdieren werden reeds beschreven bij neushoorns, de ene al wat succesvoller dan de andere.

Variaties in de kwaliteit van het afgenomen sperma komen vaak voor. Om te bevestigen dat het sperma van een bepaalde stier van slechte kwaliteit is, zijn herhaaldelijke evaluaties noodzakelijk.

Het zoeken naar de juiste bewaringstechnieken voor neushoornsperma zal naar de (nabije) toekomst toe zeer belangrijk worden om de soorten en om de genetische diversiteit te behouden. Ook het gebruik van geassisteerde voortplantingstechnieken zoals KI zouden een goede hulp kunnen bieden om fokprogramma's te verbeteren.

***Sleutelwoorden: electro-ejaculatie – KI – neushoorn – reproductieve problemen – sperma***

## Inleiding

---

### Situering

Verschillende zoogdiersoorten, waaronder neushoorns, worden met uitsterven bedreigd. Een van de belangrijkste oorzaken hiervan is inname van de habitat door en voor menselijke activiteiten. Bij neushoorns komt daar nog een belangrijkere factor bij, namelijk de jacht op de dieren voor hun hoorn.

Vandaag de dag zijn er nog vijf overlevende neushoornsoorten; 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).

Fokprogramma's worden steeds belangrijker om soorten tegen uitsterven te beschermen. Jammer genoeg zijn de voortplantingsresultaten in gevangenschap bedroevend laag. Bij de vrouwelijke witte neushoorn werden hier tal van problemen mee geassocieerd, namelijk acycliciteit, afwijkende cycli, bevruchtingsproblemen, ... (Hermes et al., 2005; Casus I: Voortplantingsproblematiek bij de vrouwelijke witte neushoorn). In het wild kent men deze problemen niet of nauwelijks.

Naast fokprogramma's wordt er ook meer en meer onderzoek verricht naar technieken om de genetische diversiteit te behouden en het interval tussen generaties te verkleinen. Deze technieken worden samengevat onder de noemer ART's, wat staat voor 'assisted reproductive techniques'. Hiertoe behoren kunstmatige inseminatie (KI), embryo transfer (ET), *in vitro* fertilisatie (IVF), micromanipulatie van gameten/embryo's, sexen van semen/embryo's en het aanleggen van genenbanken, ook "frozen zoos" genoemd (Leibo en Songsasen, 2002).

Opmerkelijk is dat er in de literatuur weinig nadruk wordt gelegd op rol van het mannelijk dier in deze problematiek. Voor een succesvolle bevruchting of voor het verwerven van sperma voor KI is de mannelijke voortplantingsfysiologie en fertiliteit uiteraard heel voornaam. Meer onderzoek in deze richting zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de ontwikkelingen in de voortplantingsproblematiek.

### Casuïstiek

De opzet van deze casuïstiek was om een zoo in Europa te volgen waar twee vrouwelijke witte neushoorns en een mannelijke witte neushoorn gehouden worden. De zoo tracht de twee vrouwelijke neushoorns drachtig te krijgen. Volgens de verantwoordelijke zijn ze mooi cyclisch en in het voorjaar zouden Duitse experts komen om sperma af te nemen van het mannelijke dier en de vrouwelijke dieren hiermee te insemineren. Jammer genoeg ging de hele procedure niet door wegens gezondheidsproblemen van het mannetje.

Ondanks dat ik niet weet om wat voor gezondheidsproblemen het ging, is dit een mooi voorbeeld van het belang van het mannelijke dier in de voortplanting. Het voorval deed veel vragen in me opkomen, zoals: "Hoe zit het met het libido van neushoorns die gehouden worden in gevangenschap?", "Kampen de mannelijke neushoorns net zoals de vrouwelijke dieren met pathologieën van het

geslachtsstelsel die zorgen voor een verminderde fertiliteit in gevangenschap?”, “Hoe verloopt KI bij neushoorns en zijn hier protocols voor beschikbaar?”, ... .

In de hierna volgende uiteenzetting heb ik getracht de voortplantingsproblematiek te bekijken vanuit het standpunt van de mannelijke neushoorn, met een bespreking van KI als een mogelijk hulpmiddel.

## Anatomie

### Penis en preputium

In rust is de penis met de tip naar caudaal gericht en wordt deze volledig bedekt door het preputium, zoals ook weergegeven wordt in figuur 1. Bij het urineren en markeren wordt de penis zichtbaar tussen de achterbenen, maar blijft naar caudaal gericht. Bij een volledige erectie buigt de penis naar craniaal.

De penis is van het musculocaverneuze type en omvat caverneuze laterale projecties van 20-25 cm lang die eveneens kunnen uitzetten bij erectie. Deze laterale peniele flaps zijn enkel aanwezig bij neushoorns en tapirs, dewelke (net zoals equidae) tot de Perissodactyla behoren.

Wat nog karakteristiek is bij neushoorns, is dat ze een paddenstoelvormige glans penis hebben. De vorm van de glans penis, samen met de laterale projecties, suggereren dat de neushoorn een cervixbezaaier is. Tijdens de 45 tot 60 minuten durende intromissie, ontplooiën de projecties in de vagina van het vrouwelijk dier, terwijl de glans penis zich in de portio vaginalis en de cervicale plooien vastzet (Hermes en Hildebrandt, 2011).

### Testikels

De testikels zijn extra-abdominaal gelegen en bevinden zich dorsolateraal van de penis, in dezelfde huidplooi als deze laatste. De positie van de testikels varieert van verticaal en duidelijk zichtbaar en palpeerbaar (caudaal van de gerelaxeerde penis), naar meer horizontaal en niet-palpeerbaar (nabij de liesringen). De dikke huid, het dense kapsel van de testikels en de variërende positie maken het zeer moeilijk om door middel van palpatie iets te zeggen over de functionaliteit of pathologische letsels (Hermes en Hildebrandt, 2011).

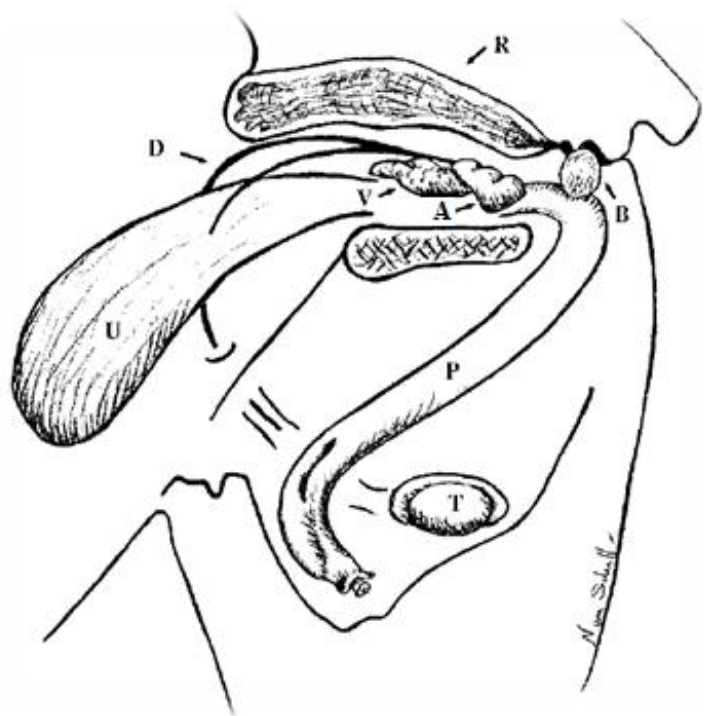


Fig. 1: Overzicht van het voortplantingsstelsel van een mannelijke neushoorn. P = penis; T = testis; D = ductus deferens; B = bulbourethrale klier; A = prostaat; V = zaadblaasje; U = urineblaas; R = rectum (uit Schaffer et al., 2001).

De manier waarop de epididymis aan de testikel vastzit varieert tussen de verschillende species. Bij de Aziatische neushoorns zijn de bijballen stevig verweven met de testikels. Deze van de witte neushoorns zijn minder stevig vastgehecht en deze van de zwarte neushoorns kennen een nog lossere adhesie (Schaffer en Beehler, 1990) (figuur 2).

## Secundaire geslachtsklieren

Schaffer en Beehler (1990) hebben de reproductieve anatomie van drie verschillende neushoornsoorten onderzocht. Zowel bij de mannelijke Indische neushoorn, als bij de zwarte en witte neushoorn waren er bulbourethrale klieren aanwezig, een prostaat en zaadblaasjes. Ampullen konden in geen van de drie neushoornspecies teruggevonden worden. Een uterus masculinus was wel aanwezig bij de Afrikaanse soorten (Schaffer en Beehler, 1990).

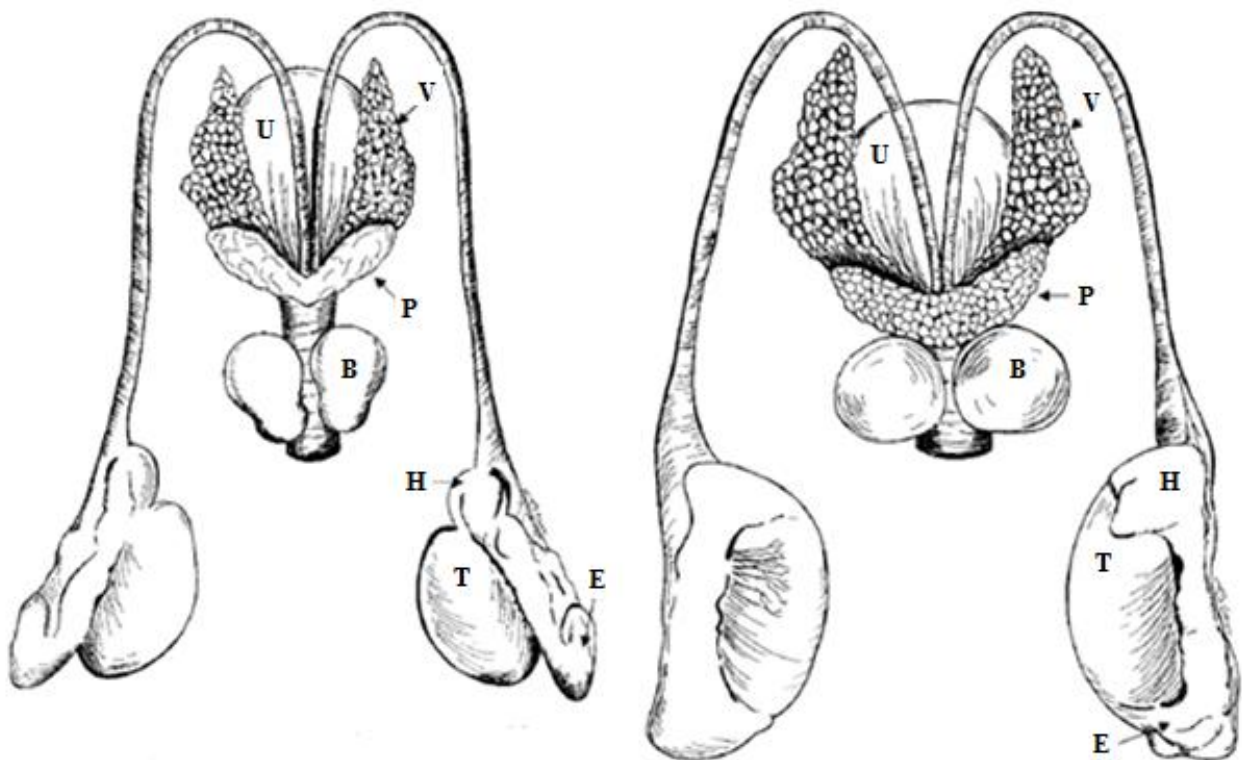


Fig. 2: Illustratie van de relatie tussen de gonaden en de secundaire geslachtsklieren bij een zwarte neushoorn (Links) en een Aziatische neushoorn (Rechts). T = testis; H = hoofd van de epididymis; E = staart van de epididymis; V = zaadblaasje; P = prostaat; B = bulbourethrale klier; U = urineblaas (uit Schaffer et al., 2001).

Alle secundaire geslachtsklieren zijn in de nabijheid van de blaashals gelegen, ventraal van het rectum (figuur 2). De gepaarde bulbourethrale klieren zijn ronde structuren die zich dorsolateraal van de urethra bevinden, juist craniaal van de anus.

De prostaat bestaat uit twee driehoekige lobben die zich aan weerszijden van de urethra bevinden, craniaal van de bulbourethrale klieren. Beide lobben zijn door een isthmus met elkaar verbonden ter



hoogte van de blaashals. Tussen de prostaat en de blaashals liggen de gepaarde zaadblaasjes. Deze zijn sigaarvormig, gelobuleerd en lopen naar craniaal uit langsheen de blaas.

Hermes et al. (2005) hebben een verband aangetoond tussen het volume van de secundaire geslachtsklieren en de spermakwaliteit van witte neushoorns. Vooraleer ze sperma afnamen, bepaalden ze met behulp van echografie de dimensies van de secundaire geslachtsklieren. De volumes waren positief gecorreleerd met het percentage motiele en intacte spermatozoa (tabel 1). De kwaliteit van het sperma wordt weergegeven in categorieën, waarbij I > II > III, maar hierover meer bij het bespreken van de spermamotiliteit (p.16).

Tabel 1: Volume van de secundaire geslachtsklieren van volwassen mannelijke witte neushoorns met een verschillende spermakwaliteit (Hermes et al., 2005).

<b>Categorie sperma</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Volume bulbourethrale klieren (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Volume prostaat (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Volume zaadblaasjes (cm<sup>3</sup>)</b>
I	12	32,6 ± 1,8 <sup>a</sup>	50,4 ± 17,4 <sup>a</sup>	46,4 ± 5,4 <sup>a</sup>
II	5	12,1 ± 1,6 <sup>b</sup>	21,8 ± 2,9 <sup>a,b</sup>	31,2 ± 3,6 <sup>a,b</sup>
III	5	11,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	19,5 ± 1,5 <sup>b</sup>	30,2 ± 3,6 <sup>b</sup>

## KI

---

### Inleiding

Kunstmatige inseminatie wordt bij runderen, paarden en andere gedomesticeerde dieren frequent toegepast. KI brengt dan ook tal van voordelen met zich mee ten opzichte van een natuurlijke dekking. Het ejaculaat van één dekking kan bijvoorbeeld verdeeld worden over verschillende inseminatiedosissen waardoor het sperma van het mannelijk dier efficiënter gebruikt kan worden. Op voorwaarde natuurlijk dat deze een goede vruchtbaarheid bezit.

Bovendien wordt met het gebruik van KI de kans op seksueel overdraagbare aandoeningen sterk verminderd. Daarnaast wordt de kans op trauma bij het dekken gereduceerd door alternatieve methoden te gebruiken om sperma te collecteren (Brinsko et al., 2011). Wat ook zeer interessant is aan KI, en dan vooral voor wildlife, is dat het transport van dieren vermeden wordt. Het gebruik van diepvriessperma geeft nog als bijkomende voordelen dat geografische belemmeringen geen rol meer spelen en dat het sperma na het overlijden van het dier nog beschikbaar is.

Een nadeel van KI is dat de kwaliteit van het sperma zeer sterk afhankelijk is van de wijze van afname en nabehandeling. Sperma is zeer gevoelig aan omgevingsinvloeden. Een ander nadeel van KI is dat de sperma-afname een risico inhoudt voor de persoon die zich hiervoor engageert. Een goede kennis, training en ervaring is dus absoluut noodzakelijk (Brinsko et al., 2011).

KI heeft zijn nut al verschillende keren bewezen door diersoortpopulaties die met uitsterven bedreigd zijn, nieuw leven in te blazen. Een voorbeeld hiervan is het succesverhaal van de reuzenpanda

(*Ailuropoda melanoleuca*). Deze prachtige diersoort is volgens het WWF een van de meest bedreigde diersoorten. Door voortplantingsproblemen bij de mannelijke populatie zag de toekomst er voor deze soort niet rooskleurig uit. De mannetjes bleken te weinig interesse te tonen om te paren. Daarbij komt nog dat de vrouwelijke panda's slechts één oestruscyclus per jaar vertonen, meestal in de periode april-mei (Platz et al., 1983).

Na jaren onderzoek, heeft men nu voldoende kennis en ervaring om KI succesvol toe te passen bij de reuzenpanda. Deze cyclus van het vrouwtje duurt twee tot zeven dagen, maar het vrouwtje is slechts 24-36h fertiel. Daarom is een zeer nabije opvolging en accurate timing van groot belang. De inseminatie is weinig invasief en gebeurt onder sedatie. Het sperma zelf wordt verkregen door het toepassen van electro-ejaculatie onder anesthesie (Platz et al., 1983).

Er werd geschat dat er in het wild nog ongeveer 1300 reuzenpanda's zouden leven. Dankzij fokprogramma's en KI bedraagt het totaal aantal panda's, gehouden in gevangenschap, nu al zo'n 300 (Panda's International, 2013).

Een gelijkaardig succesverhaal vond en vindt nog steeds plaats bij de Cheetah (*Acinonyx jubatus*). Hopelijk kunnen we in de toekomst ook spreken van een succesverhaal bij de neushoorn.

## Sperma-afname

Om het voortplantingspotentieel van een mannelijke neushoorn te bepalen is het van belang om de geslachtstractus klinisch goed te evalueren, en om sperma af te nemen en dit te analyseren.

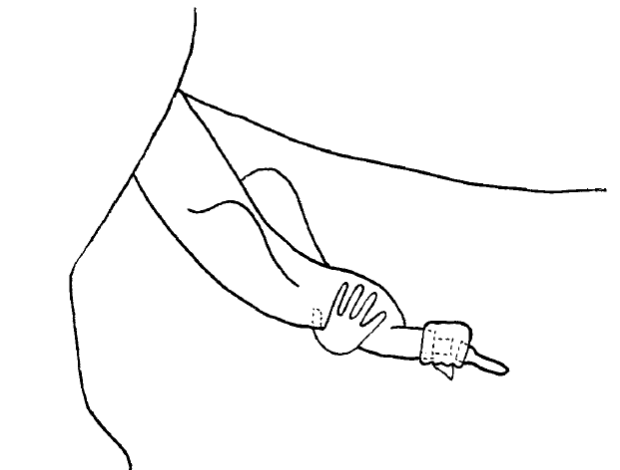
In het algemeen kunnen ejaculaten van stieren verkregen worden vanaf een leeftijd van zes jaar tot zo'n 42-jarige leeftijd. Spermakwaliteit wordt niet beïnvloed door de leeftijd en blijft dus hoog ondanks de aanwezigheid van testiculaire fibrose. Ook het seizoen heeft geen invloed op de spermaproductie en androgeenconcentratie (Hermes et al., 2005).

Ejaculatie bij neushoorns is niet zoals bij andere diersoorten. De intromissie duurt langer en technieken die gebruikt worden voor sperma-afname bij andere zoogdieren, kunnen vaak niet zomaar gebruikt worden bij neushoorns (Schaffer et al., 1998).

Verschillende methoden werden reeds onderzocht en toegepast:

- *Manuele massage van de penis*

Schaffer et al. (1990) beschrijven de peniele massage bij een Indische neushoorn. Het wrijven aan de mediale zijde van de achterbenen en het aanraken van het abdomen zorgde er steeds voor dat het dier uitschachtte. Wanneer de penis daarna verder gestimuleerd werd, kwam hij tot een erectie. Hierbij werd de tip van de penis naar craniaal gebracht en zetten ook de laterale plooiën van de penis uit. Ejaculatie van seminaal vocht trad op bij



een volledige erectie van de penis. Deze had daarbij een volledige lengte van 60-70 cm.

Schaffer et al. (1990), verkregen met behulp van deze methode een volumineuze hoeveelheid helder, visceus vocht, maar de concentratie van het sperma was arm. Bovendien moet rekening gehouden worden met het feit dat aan deze methode soms jaren van training vooraf gaan.

Hermes et al. (2001) pasten manuele massage van de penis toe op twee geconditioneerde witte neushoorns. Hierbij verkregen ze weinig volumineuze ejaculaten van 1-2 ml (n = 20). De gemiddelde concentratie was  $262 \times 10^6$  spermacellen/ejaculaat en  $217,3 \times 10^6$  spermacellen/ml. Macroscopisch werden de stalen gekarakteriseerd als helder vocht met daarin witte, wormachtige filamenten. Deze filamenten waren dense aggregaten van spermatozoa met een motiliteit van slechts 10-30% en geen of weinig voorwaartse progressie. Onmiddellijke toevoeging van een verdunner aan deze stalen zorgde ervoor dat de filamenten oplosten en dat de motiliteit steeg tot 70-80% met een zeer goede voorwaartse progressie.

De aanwezigheid van dergelijke filamentachtige aggregaten suggereert dat de spermatozoa die opgeslagen liggen in de vas deferens, passief verder doorgestuwd worden zonder verdere toevoeging van secreties van de secundaire geslachtsklieren (Hermes et al., 2001).

In een artikel van 1993 beschrijven Schaffer et al. de manuele peniele stimulatie als de meest gebruikte en gemakkelijkst uit te voeren manier van sperma-afname.

- *Rectale stimulatie van de secundaire geslachtsklieren*

Rectale massage houdt het masseren in van de secundaire geslachtsklieren juist binnenin de anus. Deze methode alleen is onvoldoende om spermarijk seminaal vocht te verkrijgen. Wanneer rectale massage gevolgd wordt door peniele massage of electro-ejaculatie, worden ejaculaten met hogere spermaconcentraties verkregen (Schaffer en Beehler, 1988). Hieruit kunnen we besluiten dat rectale massage een goed hulpmiddel is en gebruikt kan worden bij neushoorns in combinatie met een andere methode van sperma-afname.

- *Collecteren van sperma na dekking*

O'Brien en Roth (2000) collecteerden sperma van Sumatraanse neushoorns (n = 5) 20-180 minuten na dekking. Dit deden ze door een opvangbakje aan een lange stok te bevestigen en door de tralies van de stal onder de vulva te houden terwijl het vrouwtje neerlag. Het sperma werd binnen de 30 minuten na collectie onderzocht. Deze stalen waren van matige kwaliteit; zowel het percentage motiliteit als viabiliteit was > 60%, maar grote aantallen morfologisch afwijkende spermatozoa waren aanwezig (tabel 2). Uit de tabel is af te leiden dat abnormale hoofden en cytoplasmadruppels het meest frequent voorkwamen.

Een voordeel van het collecteren van een post-coitaal spermastaal, is dat het gaat om een natuurlijk ejaculaat. Een nadeel is dan weer dat het sperma van een lagere kwaliteit kan zijn omdat het sperma met de hoogste kwaliteit waarschijnlijk in de vrouwelijke geslachtstractus achterblijft (O'Brien en Roth, 2000).

Tabel 2: Karakteristieken van post-coitaal sperma van Sumatraanse neushoorns (O'Brien en Roth, 2000).

Parameter	Gemiddelde ± standaardafwijking (n=5)
Karakteristieken ejaculaat	
- verkregen volume (ml)	104,0 ± 9,1
- osmolaliteit (mosm/kg)	284,3 ± 1,3
- pH	7,9 ± 0,1
- sperma concentratie (x10 <sup>6</sup> /ml)	24,6 ± 8,0
- totaal aantal spermatozoa (x10 <sup>9</sup> )	2,5 ± 0,8
Karakteristieken sperma	
- motiliteit (%)	60,0 ± 3,2
- voorwaartse progressieve motiliteit (0-5) <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1
- sperma motiliteitsindex <sup>b</sup>	57,0 ± 2,0
- viabiliteit (%)	72,0 ± 3,2
- intacte acrosomen (%)	79,8 ± 6,5
- morfologisch normaal (%)	40,2 ± 6,3
- morfologisch abnormaal	
o abnormaal hoofd <sup>c</sup>	33,2 ± 2,1
o bicephaal	0,8 ± 0,4
o gekrulde flagel	1,8 ± 0,4
o dubbele staart	0,4 ± 0,2
o abnormaal middenstuk	1,6 ± 0,7
o krom middenstuk	6,8 ± 3,1
o kromme flagel	0,6 ± 0,4
o cytoplasmadruppel	14,2 ± 5,4
o spermatide	0,4 ± 0,4

<sup>a</sup>Voorwaartse progressieve motiliteit van spermatozoa wordt subjectief beoordeeld op een schaal van 0 tem 5, waarbij 0 = geen beweging en 5 = snelle voorwaartse progressie.

<sup>b</sup>Motiliteitsindex van het sperma = (% motiliteit + (progressieve motiliteit x 20))/2

<sup>c</sup>Zowel micro- als macrocephaal.

Een ander probleem bij het verzamelen van post-coitaal sperma was een overvloedige aanwezigheid van leukocyten. De kwaliteit van het sperma blijkt omgekeerd evenredig met de tijd die verloopt tussen copulatie en collectie. Het optreden van een ontstekingsreactie na KI is een natuurlijke fysiologische respons, welke in verschillende species gezien wordt inclusief paarden (Troedsson et al., 1998). De oorsprong van de leukocyten in het neushoornsperma is onbekend, maar men vermoedt dat het van vrouwelijke origine is, vermits het aantal stijgt naarmate het interval tussen copulatie en collectie groter wordt. Het is dus aan te raden om zo snel mogelijk na de copulatie stalen te verzamelen om de concentratie aan leukocyten te minimaliseren en de spermakwaliteit zo hoog mogelijk te houden (O'Brien en Roth, 2000).

#### ▪ Epididymaal sperma

Epididymaal sperma is een goede bron voor het verkrijgen van (postmortaal) sperma voor ART's. Om dit sperma te bekomen dient een incisie te worden gemaakt langsheen de laterale zijde van de basis van de koker om de testikel, omgeven door de tunica vaginalis, er uit te kunnen halen. Om het sperma vervolgens uit de epididymis te collecteren zijn er verschillende technieken, afhankelijk of het gaat om een Afrikaanse of een Aziatische neushoorn vermits de morfologie van de epididymis tussen beide soorten significant verschilt. De tubuli van Afrikaanse soorten zijn zeer smal en dicht op elkaar gepakt waardoor de caudae epididymis op verschillende plaatsen ingesneden moet worden om sperma te

kunnen collecteren. Hierbij worden er slechts kleine volumes verkregen (1-2 ml). Bij de Indische neushoorn daarentegen is de cauda van de epididymis rond, stevig en duidelijk aanwezig aan de distale pool van de testikel. De lumina van de tubuli zijn relatief groot waardoor het semen gemakkelijk geïncubeerd kan worden door het weefsel verschillende keren te punteren met een 16G naald. Bij deze Aziatische soort kunnen volumes verkregen worden van in totaal 18,7 ml tot 25 ml (Schaffer et al., 1993).

- *Kunstvagina*

Sperma-afname met een kunstvagina is, in tegenstelling tot de hengst, weinig succesvol bij neushoorns (Schaffer en Beehler, 1988; Roth et al., 2005).

Schaffer et al. (1990) beschrijven het gebruik van een met water gevulde kunstvagina vervaardigd uit een PVC-buis (figuur 4). De diameter moet breed genoeg zijn zodat de laterale plooiën van de penis ook kunnen uitzetten bij erectie.

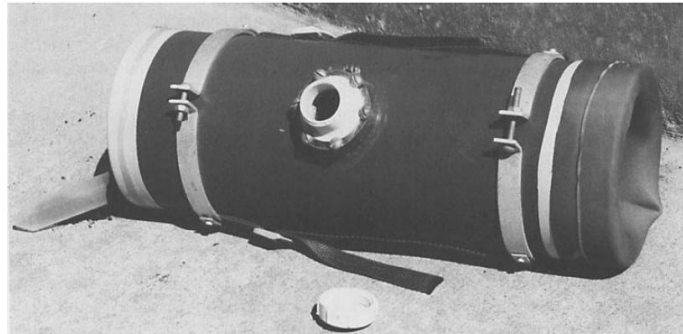


Fig. 4: Een met water gevulde, uit een PVC-buis vervaardigde, kunstvagina voor gebruik bij neushoorns (uit Schaffer et al., 1990).

Dergelijke kunstvagina was zwaar en bevatte twee handvaten zodat ze door meer dan één persoon vastgehouden kon worden.

Dit type was niet praktisch in gebruik en veroorzaakte beschadigingen aan de laterale plooiën van de penis. Daarom ontwikkelden de onderzoekers een andere artificiële vagina waarbij enkel het distale deel (15-20 cm) van de penis bedekt werd. Bovendien was het materiaal dat gebruikt werd lichter en was er een hendel aangebracht die toeliet de kunstvagina alleen te hanteren (figuur 5).



Fig. 5: Een met water gevulde latex kunstvagina voor stimulatie van de distale tip van de penis van neushoorns (uit Schaffer et al., 1990).

Ondanks de verbeteringen bleef het zeer moeilijk om de neushoorns te laten ejaculeren met de kunstvagina. Allereerst is het niet evident om een neushoorn aan te zetten tot erectie waardoor een goede plaatsing van de kunstvagina moeilijk is. Bovendien is het behouden van de erectie na plaatsing van de kunstvagina ook een hele uitdaging. Als er dan al neushoorns waren die tot ejaculatie aangezet konden worden, werden hoge volumes verkregen, maar deze waren arm aan spermatozoa (Schaffer en Beehler, 1988; Schaffer et al., 1990). Om de ideale temperatuur voor ejaculatie te bepalen, gebruikten Schaffer et al. (1990) de kunstvagina's bij 35-40°C of bij 40-45°C. Bij een temperatuur tussen de 40 en 45°C werden ejaculaten verkregen.

- *Electro-ejaculatie*

De afname van sperma met behulp van electro-ejaculatie bij neushoorns werd voor het eerst gerapporteerd in 1979 door Platz et al. Sindsdien is het materiaal alsook de methode steeds verbeterd.

In 2001 beschreven Hermes et al. de toepassing van electro-ejaculatie bij acht mannelijke witte neushoorns, steeds onder anesthesie. Het ejaculaat werd geïncubeerd in 3-12 fracties met een gemiddeld volume van  $124 \pm 21,1$  ml. Het gemiddelde aantal spermatozoa per ml ejaculaat was  $48,11 \pm 12,6 \times 10^6$  en het totale aantal spermatozoa per ejaculaat was  $2,37 \pm 0,8 \times 10^9$ . De motiliteit was continu hoog ( $\geq 60-95\%$ ) in zes stieren, variabel ( $\geq 35-90\%$ ) in twee stieren en continu onvoldoende ( $\geq 10\%$ ) in een stier.

Bij electro-ejaculatie moet rekening gehouden worden met het feit dat urine contaminatie kan optreden. Dit hetzij door overstimulatie of door een verkeerde plaatsing van de probes. Gecontamineerde stalen zijn te herkennen aan een groter volume en een verminderde motiliteit, naast de veranderingen in geur en kleur (Hermes et al., 2001 en 2005).

Hildebrandt et al. (2002), Roth et al. (2005) en Hermes et al. (2005) gebruikten een rectale probe voor electro-ejaculatie die volledig aangepast was aan de anatomie van het voortplantingsstelsel van de mannelijke neushoorn. De probes waren zo ontwikkeld dat er optimaal contact was tussen de elektroden op het hoofd van de probe en de accessoire geslachtsklieren. Hierdoor konden meer betrouwbare resultaten verkregen worden dan voordien.

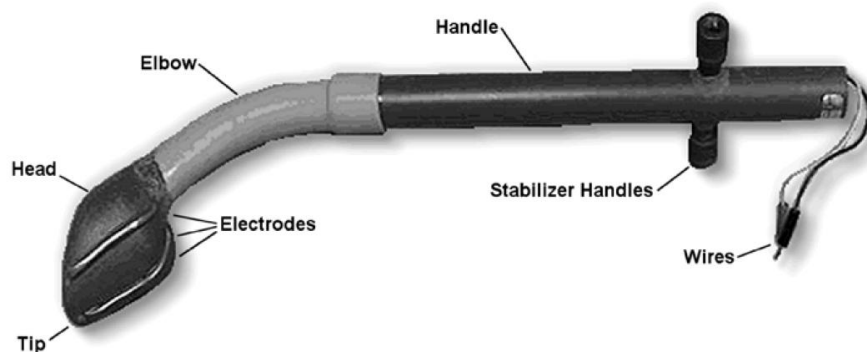


Fig. 6: Rectale probe voor electrostimulatie van neushoorns, ontwikkeld door Roth et al. (2005).

Roth et al. (2005) beschreven stap voor stap de uitvoering van de electro-ejaculatie. Eerst werd het dier onder anesthesie gebracht. Vervolgens werden de achterbenen van de neushoorn met touwen vastgelegd aan de omheining. Feces werden uit het rectum verwijderd en de penis werd uit de schede gehaald en gewassen. Hierna kon de rectale probe voorzichtig worden ingebracht, voorzien van voldoende glijmiddel. Eens de probe ingebracht was tot net voorbij de anale sfincter, werd het handvat omhoog gebracht zodat het hoofd van de probe naar beneden werd gedrukt en zo goed contact maakte met de secundaire geslachtsklieren. De electrostimulatie zelf werd uitgevoerd in drie tot vijf series, met steeds een toenemende voltage. Er vonden ongeveer 30 stimulaties per serie plaats met tussenin een rustinterval van 5 min. Tijdens de rustintervallen werd de probe verwijderd en werd manuele rectale massage toegepast. Ook massage van de penis vond plaats, zowel tijdens stimulatie als tijdens de rustperiode.

Eens het mannetje vocht begon te produceren, werden de opvangbakjes frequent verwisseld om contaminatie van een fractie van goede kwaliteit met een slechte kwaliteitsfractie te vermijden. Dit was absoluut noodzakelijk, vermits de kwaliteit van het ene ejaculaat vergeleken met het volgende enorm kon variëren.

Typisch was ook dat de initiële vochtmissies aspermatisch of sterk verdund waren. Bij toenemende stimulaties werden de fracties meer en meer geconcentreerd met spermatozoa, totdat een maximale concentratie bereikt werd, daarna trad opnieuw verdunning op. Dit patroon varieerde echter sterk.

De neushoorns begonnen meestal te ejaculeren bij 200-300 mA (en een voltage van 7-8 V). Geconcentreerde, spermarijke stalen werden eerder verkregen bij 300-400 mA.

In onderstaande tabel (tabel 3) worden de resultaten weergegeven, verkregen door Roth et al. (2005).

Tabel 3: Electro-ejaculatie parameters uitgedrukt in gemiddelden  $\pm$  SD, met een onderscheid tussen fracties van goede en slechte kwaliteit (Roth et al., 2005).

Parameter	Ejaculaten met fracties van goede kwaliteit	Ejaculaten met fracties van slechte kwaliteit
Leeftijd van de neushoorn (jaar)	20,1 $\pm$ 3,3 (7-34)	24,1 $\pm$ 2,9 (13-34)
Maximale stimulatie (V)	8,7 $\pm$ 0,4 (8-10)	9,7 $\pm$ 0,5 (8-12)
Maximale hoeveelheid mA	315,7 $\pm$ 18,5 <sup>b</sup> (250-400)	398,6 $\pm$ 29,3 <sup>c</sup> (300-550)
Aantal stimuli	118,9 $\pm$ 18,6 (83-225)	126,9 $\pm$ 7,4 (98-150)
Volume van het ejaculaat (ml)	98,2 $\pm$ 21,8 (36-200)	84,9 $\pm$ 21,6 (0,5-150)
Volume van de kwaliteitsvolle fractie (ml)	24,1 $\pm$ 4,0 (15-40)	-
pH	8,5 $\pm$ 0,1 (7,9-9,0)	8,5 $\pm$ 0,2 (7,9-9,5)
Osmolaliteit (mOsm/kg)	290,4 $\pm$ 6,7 (272-322)	299,2 $\pm$ 15,4 (262-368)
Totaal aantal spermatozoa ( $\times 10^9$ /ml)	37,1 $\pm$ 12,0 (1,8-66,4)	10,5 $\pm$ 6,4 (0-43)
Spermamotiliteit (%)	80,7 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup> (60-90)	12,3 $\pm$ 7,5 <sup>c</sup> (0-50)
Progressieve motiliteit van het sperma (%)	2,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup> (2,0-3,5)	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup> (0-3,0)
Structureel normaal sperma (%)	41,6 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup> (28-74)	21,0 $\pm$ 5,3 <sup>c</sup> (4-37)
Urine contaminatie <sup>d</sup>	5	2
RBC contaminatie <sup>d</sup>	2	2

<sup>b,c</sup> Waarden met een verschillend superscript in dezelfde rij, zijn significant verschillend.

<sup>d</sup> Wanneer een van de fracties urine of RBC bevatten tijdens de electro-ejaculatie procedure, werd het staal als gecontamineerd geteld. De goede kwaliteitsfractie zelf bevatte geen urine of RBC.



Fig. 7: (a) Nadat de neushoorn onder anesthesie is gebracht, wordt de mest uit het rectum verwijderd en kan de rectale probe ingebracht worden. (b) De figuur geeft weer hoeveel mensen er bij een dergelijke procedure nodig zijn; iemand houdt de probe vast, iemand bestuurt de electro-ejaculator, verschillende personen masseren de penis en collecteren het ejaculaat en iemand houdt de anesthesie continu in de gaten. (uit Roth et al., 2005)



Vandaag de dag is het mogelijk om sperma, verkregen met behulp van electro-ejaculatie, te gebruiken voor geassisteerde voortplantingstechnieken en ook om spermastalen te verkrijgen die van voldoende hoge kwaliteit zijn om deze in te vriezen. Sperma dat goed genoeg is om te gebruiken voor ART's, heeft volgens Roth et al. (2005) een motiliteit  $\geq 60\%$  en een concentratie van  $\geq 20 \times 10^6$  spermatozoa/ml.

Ondanks deze vooruitgangen variëren de resultaten van electro-ejaculatieprocedures nog steeds sterk, zelfs voor eenzelfde dier. Indien een spermastaal van een neushoorn van slechte kwaliteit is, wil dit nog niets zeggen over de fertiliteit. Het kan zijn dat de procedure niet effectief was waardoor een vertekend beeld verkregen werd van het voortplantingspotentieel van de neushoorn.

Hoewel Schaffer et al. (1993) de manuele massage van de penis als de meest gebruikte en gemakkelijkst uit te voeren manier van sperma-afname beschreven, wordt electro-ejaculatie vandaag de dag meer gebruikt. In de studie van Hermes et al. (2001) werden grotere volumes verkregen bij electro-ejaculatie in vergelijking met manuele massage van de penis. Schaffer et al. (1998) verkregen bij het uitvoeren van de peniele massage ook slechts kleine volumes sperma. Zij schreven dit toe aan het onvoldoende geconditioneerd zijn van de dieren. Deze veronderstelling wordt wat minder waarschijnlijk door het onderzoek van Hermes et al. (2001) vermits de twee mannelijke dieren waarbij men de peniele stimulatie toepaste al gedurende lange tijd geconditioneerd waren.

Wat wel vaststaat, is dat electro-ejaculatie in combinatie met rectale of peniele massage betere resultaten geeft ten opzichte van electro-ejaculatie alleen.

## **Het belang van echografie**

Echografie kan zowel transrectaal gebruikt worden om de secundaire geslachtsklieren in beeld te brengen, als transcutaan om testes en epididymis te evalueren. Het is een zeer goed hulpmiddel om de reproductieve gezondheidsstatus te evalueren en om mogelijke afwijkingen aan de voortplantingsorganen op te merken. Veranderingen in echogeniciteit kunnen wijzen op een mogelijk afwijkende structuur (Hermes et al., 2005 en 2006).

Echografie van de secundaire geslachtsklieren is zeer bruikbaar bij electro-ejaculatie om de plaats voor de probes precies te bepalen en zo op het meest gevoelige punt te stimuleren.

Schaffer et al. (1998) hebben een echografische monitoring gedaan van kunstmatig gestimuleerde ejaculaties in verschillende neushoornspecies. De kunstmatige stimulatie gebeurde aan de hand van manuele massage van de penis en rectale electro-ejaculatie. Uit de resultaten bleek dat echografie een goed hulpmiddel was om de effecten van de stimulatorische methoden op de morfologie van de pars pelvina van de urethra en de spermaflow te monitoren.

Neushoorns vertonen net zoals andere zoogdieren twee stadia: eerst emissie van het semen en nadien ejaculatie. Onder emissie wordt het transport van het vocht van de vas deferens en de secundaire geslachtsklieren in de urethra begrepen, en ejaculatie is de voortstuwing van het vocht vanuit de pars pelvina van de urethra door contracties van de perineale spieren.

In andere diersoorten, waaronder de hengst, resulteert ejaculatie in veranderingen in structuur en echogeniciteit van de zaadblaasjes. In neushoorns daarentegen werden dergelijke veranderingen niet waargenomen (Schaffer et al., 1998). Wat wel met echografie gezien werd, was de vulling van de pars pelvina van de urethra (caudaal van de colliculus seminalis) bij emissie van semen. Deze 'opslagplaats' zorgt voor volume en kracht om het sperma voort te stuwen doorheen de hele lengte van de penis en de moeilijk doorgankelijke cervix van het vrouwelijk dier. Wat ook opmerkelijk was, was dat het sperma bij neushoorns langer in de urethra verbleef in vergelijking met andere dieren.

## Evaluatie sperma

Na het afnemen van sperma worden allereerst de geur en de kleur geëvalueerd. Urine- of bloedbimengingen worden zo al snel geconstateerd. Ook de aanwezigheid van geaggregeerde filamenten zoals in de studie van Hermes et al. (2001) kunnen zo opgemerkt worden.

Vervolgens volgt de bepaling van het volume, de concentratie, motiliteit, viabiliteit, morfologie, ... .

De kwaliteit van het sperma is niet afhankelijk van het volume, de pH (8,5-9) of de osmolaliteit (290-300 mOsm/kg). Belangrijkere parameters zijn de motiliteit, de viabiliteit en de morfologie van het sperma (Hermes en Hildebrandt, 2011).

In gedomesticeerde dieren is de spermamotiliteit en –morfologie positief gecorreleerd met het drachtpercentage. Analoog, worden de spermamotiliteit en –morfologie in spermarijke fracties van neushoorns gebruikt om de kwaliteit in te schatten. De spermakwaliteit wordt beschouwd als een goede indicator voor het bevruchtigingspotentieel (Hermes en Hildebrandt, 2011).

Schaffer en Beehler (1988) stelden een tabel samen met parameters om spermastalen te kunnen analyseren en vergelijken (tabel 4). De tabel is gebaseerd op stalen verkregen door gebruik te maken van verschillende collectiemethoden. Jammer genoeg werd het resultaat niet vermeld per gebruikte methode. Ook Hermes en Hildebrandt (2011) gaten de gemiddelde waarden van verkregen sperma-analyses in tabelvorm (tabel 5). Zij maakten wel een onderverdeling per wijze van afname.

Tabel 4: Waarden bekomen na analyse van spermastalen gecollecteerd met behulp van verschillende methoden (Schaffer en Beehler, 1988).

<b>Species</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>Sperma concentratie (x 10<sup>6</sup>/ml)</b>	<b>Motiliteit (%)</b>	<b>Abnormaliteit (%)</b>
Zwarte NH (n = 3)	0,2-60	0,1-80	0-90	40-90
Witte NH (n = 3)	0,2-8	2,0-300	0-80	20-86
Indische NH (n = 2)	0,1-500	0,0-20.000	0-95	5-92

Tabel 5: Gemiddelde spermakarakteristieken bij neushoorns (Hermes en Hildebrandt, 2011).

Species	Collectie-methode	Volume (ml)	Sperma concentratie ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Motiliteit (%)	Normale morfologie (%)
Zwarte NH	Manueel	62	15	-	-
	EE	17-58	18-58	40-50	29
Witte NH	Manueel	0,7	7	-	-
	EE	30-80	165	71	69
Indische NH	Manueel	4-17	1738	16	-
	EE	92-160	124-377	48-72	34-39
Sumatraanse NH	Post-coïtaal	104	25	60	40
	EE	21	1,5	55	8

EE = Electro-ejaculatie.

Uit de bovenstaande tabellen kan geconcludeerd worden dat de waarden sterk variëren tussen de verschillende species, maar ook tussen de verschillende collectiemethoden. In de tabel van Hermes en Hildebrandt (2011) vallen, net zoals in de tabel van Schaffer en Beehler (1988), de hoge waarden op bij de Indische neushoorn.

Schaffer et al. (1990) hebben de verschillende methoden om sperma af te nemen vergeleken aan de hand van het volume, de concentratie en de motiliteit van het verkregen sperma bij een Indische neushoorn (tabel 6). Hieruit concludeerden ze dat de beste resultaten verkregen werden door de combinatie van electro-ejaculatie en peniele massage.

Tabel 6: Vergelijking van semenparameters verzameld met behulp van verschillende methoden bij een Indische neushoorn (Schaffer et al., 1990).

Species	Methode	Volume (ml)	Sperma concentratie ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Motiliteit (%)
Indische NH	PM (n = 12)	16,9 (0,2-50,0)	7,1 (0,0-208)	15,8 (0,0-80)
	KV (n = 3)	46,7 (30-60)	-	-
	RM (n = 1)	3,0	55	30
	EE	-	-	-
	RM + PM (n = 6)	10,6 (2,0-20,0)	142,5 (0,1-352)	50 (30-80)
	EE + PM (n = 4)	0,7 (0,1-2,0)	186,4 (5-500)	73 (70-80)

PM = Peniele Massage; KV = kunstvagina; RM = rectale massage; EE = Electro-ejaculatie.

### 6.6.1. Opmerkingen:

- *Volume*

In het algemeen ejaculeren neushoorns grote volumes sperma. De volumes die verkregen worden na sperma-afname variëren van 0,1 tot 200 ml en worden sterk beïnvloed door de manier van sperma-afname, het materiaal dat gebruikt wordt, het stimulatieprotocol en de persoon die het sperma afneemt. Ejaculaten verkregen met behulp van electro-ejaculatie of opvangen na dekking, geven de meest consequente gemiddelde volumes (17-160 ml). Waarschijnlijk benaderen deze methoden het

volume van het natuurlijk ejaculaat het meest (Hermes en Hildebrandt, 2011). De lage waarden die verkregen werden door Schaffer en Beehler (1988) bij de witte neushoorn, worden toegeschreven aan een onvolledige ejaculatie.

- *Aantal spermacellen in een ejaculaat*

Hermes et al. (2001) rapporteerden een significant verschil in het totaal aantal spermacellen per ml ejaculaat in functie van de leeftijd van de stieren. Stieren  $\geq 30$  jaar hadden gemiddeld  $4,16 \pm 2,3 \times 10^9$  spermatozoa/ml ejaculaat, terwijl stieren  $< 30$  jaar gemiddeld  $1,56 \pm 0,36 \times 10^9$  spermatozoa/ml ejaculaat telden.

- *Motiliteit*

Gebaseerd op het aantal progressief motiele spermatozoa, verdeelden Hermes et al. (2005) het sperma van witte neushoorns in drie categorieën. Categorie I hield een hoge progressieve motiliteit in van  $\geq 75\%$  en dus ook een zeer goed bevruchtingspotentieel. Categorie II was de intermediaire klasse ( $< 75\%$  en  $\geq 50\%$ ) en sperma van categorie III had een lage motiliteit van  $< 50\%$ . Stalen met een motiliteit van 60% bleken voldoende fertiel om te gebruiken voor geassisteerde voortplanting en bewaring van sperma (O'Brien en Roth, 2000).

Tabel 7: sperma parameters in 34 ejaculaten van 21 witte neushoorns, op volgorde van % progressief motiele spermatozoa (Hermes et al., 2005).

<b>Categorie ejaculaat</b>	<b>Motiliteit sperma (%)</b>	<b>Intact sperma (%)</b>	<b>Volume (ml) (%)</b>	<b>Sperma concentratie (<math>10^6</math>/ml)</b>	<b>Totaal aantal spermatozoa (<math>10^9</math>/ejaculaat)</b>
I (n = 21)	$86,8 \pm 1,3$	$75,8 \pm 3,2$	$67,4 \pm 16,4$	$75,8 \pm 15,6$	$2,8 \pm 0,8$
II (n = 5)	$67,0 \pm 3,4$	$52,3 \pm 7,4$	$55,5 \pm 18,0$	$40,8 \pm 18,8$	$1,3 \pm 0,4$
III (n = 8)	$33,8 \pm 6,7$	$60,8 \pm 9,1$	$116,5 \pm 33,4$	$18,9 \pm 9,9$	$1,1 \pm 0,3$

Opvallend was dat de ejaculaten die tot categorie I behoorden, niet alleen de hoogste motiliteit hadden, maar ook het grootste aantal morfologisch intacte spermatozoa en de hoogste spermaconcentratie.

- *Sociale status*

De spermacategorie, zoals weergegeven in tabel 7, bleek volgens Hermes et al. (2005) ook geassocieerd te zijn met de structuur van de groep waarin de neushoorns werden gehouden. Dit laatste suggereert dat sociale status de reproductieve parameters beïnvloedt.

De rol van de sociale structuur werd onder andere duidelijk in het volgende proefopzet van Hermes et al. (2005). Zij beschrijven de verplaatsing van een subdominant mannelijk dier met een lage spermakwaliteit, van een groep met vijf mannelijke dieren en zes vrouwelijke dieren naar een eigen territorium. Hier werd het mannetje niet gestoord door andere stieren en had hij toegang tot verschillende cyclerende vrouwelijke neushoorns. Dit laatste was te merken wanneer zes maanden later opnieuw sperma werd afgenomen. De spermakwaliteit was van laag naar hoog gegaan, het

oorspronkelijk subdominant mannetje plantte zich na de verandering van het groepsmanagement zonder problemen voort.

In het algemeen zijn testosteronconcentraties positief gecorreleerd aan zowel libido als spermatogenese. Om na te gaan wat gestegen testosteronconcentraties teweegbrengen op het gebied van libido, spermatogenese en fertiliteit bij neushoorns, dient nog verder onderzocht te worden (Christensen et al., 2009).

Eerdere studies van Rachlow et al. (1998) en Kretzschmar et al. (2004) toonden al aan dat territoriale mannelijke neushoorns hogere testosteronconcentraties vertonen dan niet-territoriale mannelijke dieren. Voor deze studies werden de testosteronconcentraties van vrijlevende neushoorns opgevolgd. In het wild hebben de mannelijke dieren elk hun territorium, of een dominante stier deelt een gebied met één of meerdere ondergeschikte mannetjes waarbij enkel het dominant dier zich zal voortplanten. De vrouwelijke dieren, in gezelschap van hun jongen en een aantal subadulten, vertoeven zich doorheen de gebieden van de mannelijke dieren (Owen-Smith, 1998).

De gedragingen en sociale interacties in het wild vormen een leidraad voor het houden van neushoorns in gevangenschap.

- *Morfologie*

Morfologische abnormaliteiten in neushoorns komen frequent voor. Volgens Schaffer en Beehler (1988) komen abnormaliteiten aan de staart van het sperma het meest voor bij de witte en Indische neushoorn, terwijl de zwarte neushoorn meer afwijkende hoofden vertoont.

- *Rhinocerotidae >< Equidae*

Als we de ejaculaten en spermakarakteristieken van neushoorns vergelijken met deze van hengsten (tabel 8), dan valt eerst en vooral op dat neushoorns geen aparte gelfractie en spermarijke fractie hebben, terwijl hengsten dit wel vertonen.

In het algemeen is het gecollecteerde volume groter bij neushoorns. Maar het gemiddelde volume van enkel de spermarijke fracties, is gelijkaardig aan de volumes van ejaculaten van paardachtigen. Wel een opvallend verschil is de pH. De pH van neushoornsperma is meer basisch (8,5) dan deze van paarden (6,7-7,5), pony's (6,8-6,9) en zebra's (7,7) (Roth et al., 2005).

Verder zijn de karakteristieken van de ejaculaten vrij gelijkaardig, de grote variaties bij neushoorns buiten beschouwing gelaten.

Tabel 8: Waarden van de meest gebruikte parameters om hengstensperma te evalueren (Juhász et al., 2000).

Parameter	Gemiddelde $\pm$ SD	Aantal hengsten waarbij evaluatie
Gelvrij volume (ml)	65 $\pm$ 26	398
	45 $\pm$ 30	417
	33,7 $\pm$ 2,13	165
	51,6 $\pm$ 31,5	8
	45,3 $\pm$ 30,9	47
Concentratie ( $\times 10^6$ /ml)	206,1 $\pm$ 168,5	398
	335 $\pm$ 232	417
	164,13 $\pm$ 39,35	165
	223 $\pm$ 148	8
	178 $\pm$ 168	47
Totaal aantal spermatozoa ( $\times 10^9$ /ejaculaat)	11,29 $\pm$ 7,13	398
	11,9 $\pm$ 9	417
	6,34 $\pm$ 1,93	165
	9,1 $\pm$ 4,7	8
	7,21 $\pm$ 6,87	47
Totale motiliteit (%)	53 $\pm$ 15	417
	76,43	165
	72,1 $\pm$ 16	47
	70,3 $\pm$ 17,4	64
Progressieve motiliteit (%)	68 $\pm$ 9	398
	53,1 $\pm$ 16,2	8
	52,7 $\pm$ 23,8	64
Levende spermatozoa (%)	65 $\pm$ 16	398
	82,56	165
	78,8	47
Morfologisch normale spermatozoa (%)	66 $\pm$ 15	398
	51 $\pm$ 15	417
	67,82	165
	47,5 $\pm$ 12,4	8
	58,2	47
	52,5 $\pm$ 20,1	64

## Bewaren sperma

### 6.6.2. Verdunner

Sperma is zeer gevoelig voor omgevingsinvloeden. De toevoeging van een verdunner is dan ook heel belangrijk indien men sperma langer wil bewaren. Bij elke daling van 10°C van de temperatuur van sperma, daalt de stofwisseling ervan met 50%. Het zaadplasma alleen zorgt voor onvoldoende bescherming tegen afkoeling. Spermaverdunners bevatten beschermende bestanddelen die ervoor zorgen dat het sperma kan overleven buiten de geslachtstractus. Lipoproteïnen, zoals deze aanwezig in melk of eidooier, beschermen het sperma tegen koudeshock door de cellulaire membranen te stabiliseren. Substraten zoals glucose worden toegevoegd als energiebron. Antibiotica kunnen toegevoegd worden om bacteriële groei te vertragen of te elimineren. De pH en osmotische druk van de verdunner dienen zo correct mogelijk afgesteld te worden om de overleving van het sperma te optimaliseren (Brinsko et al., 2011). Sperma is iso-osmotisch met andere lichaamsvloeistoffen zoals bloed, daarom wordt een osmolaliteit van ongeveer 300 mOsmol/kg nagestreefd. Optimale waarden

voor de pH van de verdunner van neushoornsperma werden niet weergegeven. Vermits het sperma van deze dieren een gemiddelde pH heeft van 8,5 zal de pH van de verdunner hoger liggen in vergelijking met de waarden bij het paard, welke optimaal tussen de 6,7 en 6,9 gelegen zijn.

Welke verdunner het best gebruikt kan worden voor de bewaring van neushoornsperma moet nog verder onderzocht worden. Spellmire en Booth (1981) hebben een studie uitgevoerd bij een Indische neushoorn waarbij ze gebruik maakten van verschillende melk- en eidooiervedunners met 4% en 7% glycerol. Er konden geen significante verschillen aangetoond worden tussen de verdunners met melk of eidooier.

Hermes et al. (2005) gebruikten Berliner Cryomedium (BC) voor het verdunnen van de door middel van electro-ejaculatie verkregen spermastalen in een 1:1 verhouding. BC werd gekozen als standaard verdunner omdat deze al effectief was bevonden bij de bewaring van sperma van verschillende bedreigde diersoorten, waaronder de zeer gevoelige spermatozoa van de olifant. De verdunner is gebaseerd op een bufferoplossing welke 2,41% TES, 0,58% Tris, 0,1% fructose en 5,5% lactose bevat. Van de bufferoplossing werd 100ml gesupplementeerd met 20% eidooier, 8ml Dimethylsulfoxide (DMSO) en 20 IE  $\alpha$ -tocopherol/ml. Dit mengsel werd een nacht bewaard bij 4-6°C, waarna het gecentrifugeerd werd (4500g voor een half uur). Het supernatans bevat de beschermende elementen, wat gebruikt kan worden voor de bewaring van sperma.

Hermes et al. (2005) analyseerden de motiliteit van het sperma van vijf zuidelijke witte neushoorns vooraleer het in te vriezen en na het ontdooien te hebben, gebruik makend van vier verschillende verdunners (tabel 9).

Tabel 9: Vergelijking van de spermamotiliteit in ejaculaten van vijf zuidelijke witte neushoorns voor en na het invriezen, gebruik makend van vier verschillende verdunners (Hermes et al., 2005).

<b>Cryoextender</b>	<b>Spermamotiliteit voor invriezen (%)</b>	<b>Spermamotiliteit na ontdooien (%)</b>	<b>Spermamotiliteit behouden (%)</b>
Originele sperma	57,0 $\pm$ 4,4	-	-
Berlin	62,6 $\pm$ 4,4	27,6 $\pm$ 3,4	49
Biladyl	53,0 $\pm$ 4,4	25,2 $\pm$ 3,5	44
Kenny gemodificeerd	57,0 $\pm$ 4,6	24,6 $\pm$ 5,6	44
Gent	47,0 $\pm$ 7,0	17,5 $\pm$ 9,7	32

Bovenstaande tabel toont aan dat BC de motiliteit van het sperma ongeveer vijf procent boven dat van het gekoelde, onverdunde sperma houdt. Biladyl en Gent vertoonden een vermindering in motiliteit van vijf procent voor het invriezen en tien procent na het invriezen.

### 6.6.3. Cryoprotectans

Cryoprotectantia worden aan spermaverdunners toegevoegd om ijsvorming en schade door het vriesproces te verminderen.

In de studie van Spellmire en Booth (1981) werd vastgesteld dat de viabiliteit van het sperma beter was naarmate er minder glycerol gebruikt werd. Aan de hand van deze studie veronderstelden de onderzoekers dat neushoornsperma gevoelig zou zijn aan glycerol.

O'Brien en Roth (2000) vergeleken het effect van glycerol en DMSO. Deze cryoprotectantia werden gekozen voor de studie vermits ze succesvol gebruikt worden voor het invriezen van spermatozoa van zoogdieren. Uit het onderzoek bleek dat na het invriezen en ontdooien, de spermakarakteristieken hetzelfde waren voor glycerol en DMSO. Glycerol bleek dus niet toxisch te zijn voor de spermatozoa van Sumatraanse neushoorns. Ook op de motiliteit en acrosoom-integriteit had glycerol geen nadelig effect. Dit staat in contrast met wat Spellmire en Booth (1981) vonden bij een Indische neushoorn en ook met wat Williams et al. (1995) vonden bij een Afrikaanse witte neushoorn. O'Brien en Roth (2000) constateerden eveneens een klein verschil bij het invriezen van spermatozoa van zwarte neushoorns. Deze waarbij glycerol als cryoprotectans werd gebruikt, hadden een lagere motiliteitsindex na het ontdooien ten opzichte van spermatozoa met DMSO als cryoprotectans. Hieruit concludeerden de onderzoekers dat de mogelijke toxiciteit van glycerol, species- of zelfs individuspecifiek kan zijn.

Verdere onderzoeken met een groter aantal dieren zijn nodig om het beste cryoprotectans voor elke neushoornsoort te bepalen.

Stoops et al. (2010) deden een overkoepelende studie waarbij DMSO en glycerol als cryoprotectantia werden vergeleken bij Indische neushoorns, alsook het gebruik van twee verschillende verdunners.

De eerste verdunner was een standaard verdunner voor hengstensperma (EQ). De tweede was een verdunner gebaseerd op magere melk/eidooier en suiker (SMEY). De exacte samenstelling is niet terug te vinden in het artikel, wel wordt vermeld dat het percentage eidooier in EQ tien maal hoger is in vergelijking met SMEY. Stoops et al. (2010) veronderstelden hierdoor dat eidooier belangrijk is in het beschermen van de membraan van neushoornsperma, vermits sperma bewaard in EQ minder gevoelig was aan koudeshock. Bovendien zorgt eidooier voor een beter behoud van de spermamotiliteit na invriezen. Het type bewaarmiddel was de eerste factor die de kwaliteit van het sperma na het ontdooien bepaalde. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen het gebruik van DMSO of glycerol (Stoops et al., 2010).



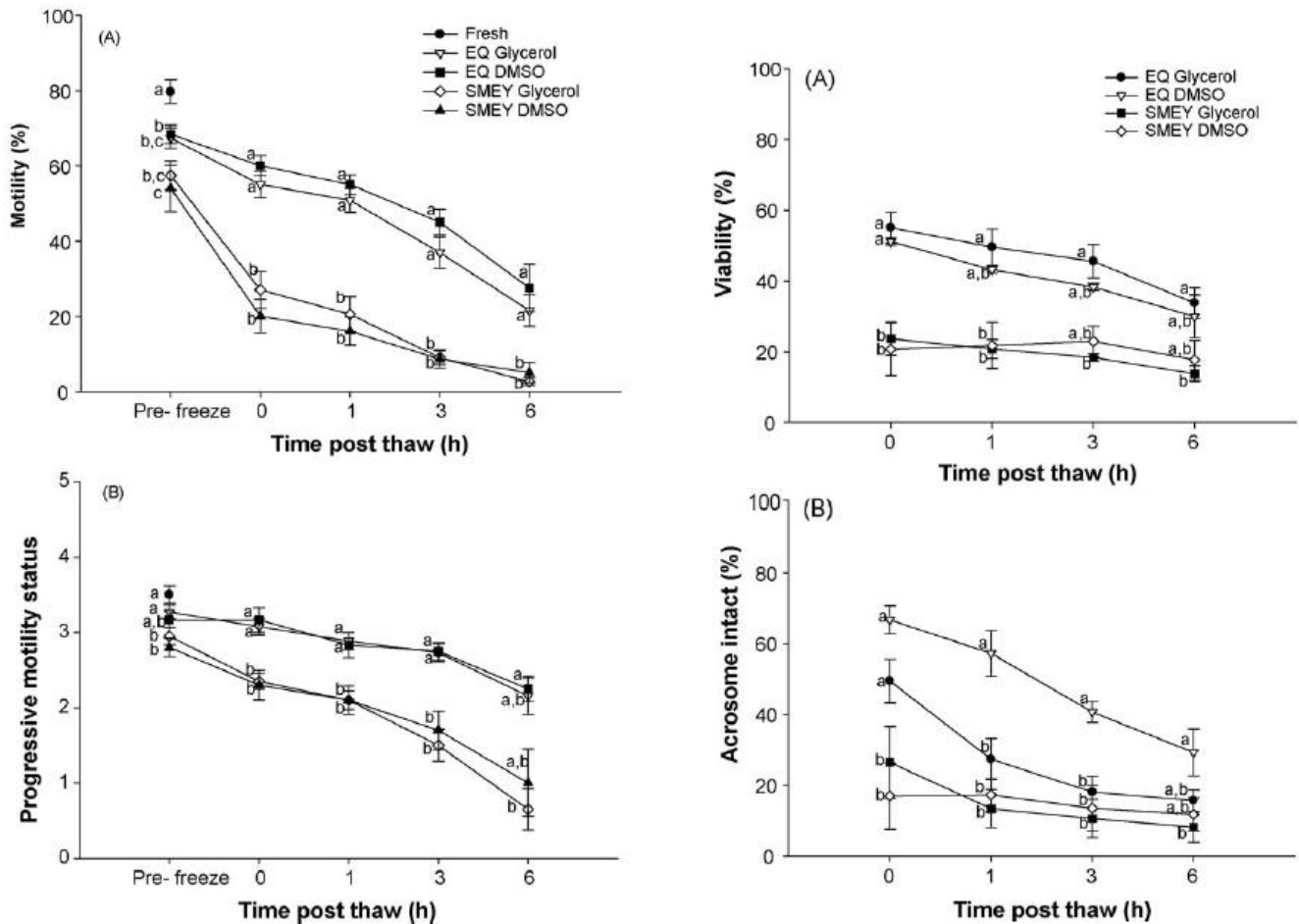


Fig. 8: Grafische weergave van het effect van verschillende verdunners en cryoprotectantia op de motiliteit, progressieve motiliteit, viabiliteit en intactheid van de acrosomen bij sperma van Indische neushoorns (n = 6 mannelijke dieren, 8 ejaculaten). Waarden met een verschillende superscript op hetzelfde tijdstip, zijn significant verschillend (uit Stoops et al., 2010).

## Verwerken sperma

### 6.6.4. Afkoelen

Hermes et al. (2005) evalueerden de gevoeligheid aan afkoeling van het sperma van neushoorns. Hiervoor gebruikten ze ejaculaten, verkregen met electro-ejaculatie, met een motiliteit van gemiddeld  $81 \pm 9\%$  (n=7). De stalen werden verdund (BC, 1:1) in buisjes van 50 ml en in de koelkast geplaatst bij een temperatuur van 4-6°C. Een half uur na afname had het sperma een kamertemperatuur bereikt van 20-23°C. Binnen 90-120 min werd de eindtemperatuur van 4-6°C bereikt. De snelheid van afkoelen bedroeg 0,15-0,20°C/min, afhankelijk van het volume van het ejaculaat. Na 24 uur afkoeling, werden de stalen gedurende 15 min op kamertemperatuur gehouden en vervolgens geïncubeerd voor 10-15 min bij 37°C vooraleer motiliteit en morfologische integriteit geëvalueerd werden.

Uit het onderzoek bleek dat neushoornsperma niet gevoelig is aan trage afkoeling. De motiliteit van het sperma bleef zo goed als constant gedurende 24 uur (Hermes et al., 2005).

In een andere studie met sperma van goede kwaliteit van Indische en zwarte neushoorns, werd pas een verminderde motiliteit opgemerkt na 72 uur van koeling. Deze lage gevoeligheid aan afkoeling vergemakkelijkt het gebruik van neushoornsperma voor KI in voortplantingsprogramma's (Hildebrandt et al., 2007).

#### 6.6.5. Invriezen

Er werd reeds sperma ingevroren van de zwarte, witte en Indische neushoorn. Hierbij werd gebruik gemaakt van zowel rietjes als pellets (Schaffer en Beehler, 1988).

Het invriezen van sperma induceert celschade, wat resulteert in celdood of functieverlies. Motiliteit, viabiliteit en morfologie zijn de belangrijkste karakteristieken om na te gaan na het ontdooien van het sperma (Hermes en Hildebrandt, 2011). Recentelijk werd DNA-fragmentatie toegevoegd als een kritische parameter om de sperma integriteit na te gaan na het ontdooien (Portas et al., 2009).

Het invriesproces verloopt het meest succesvol wanneer enkel de spermarijke fractie ingevroren wordt. Anders is de kwaliteit bij het ontdooien ondermaats. Het vocht van de secundaire geslachtsklieren wordt aanzien als één van de factoren die het invriezen van neushoornsperma bemoeilijken (Schaffer en Beehler, 1988).

Om dit seminaal plasma te verwijderen kunnen de stalen gecentrifugeerd worden. Hermes et al. (2005) deden dit gedurende 10 min bij kamertemperatuur, na de ejaculaten te hebben verdund met BC in een 1:1 verhouding. Vervolgens kon het supernatans verwijderd worden en konden de stalen opnieuw verdund worden met BC, tot vier maal het oorspronkelijke volume. Na deze stap kon men beginnen met het invriesproces.

In het algemeen wordt sperma ingevroren in rietjes van 0,5 ml in vloeibare stikstof. Deze invriesmethode geeft goede resultaten bij verschillende species en is goed bruikbaar onder praktijkomstandigheden. Een nieuwe invriesmethode die gebruik maakt van een lineaire temperatuursgradiënt, zou volgens Reid et al. (2009) nog betere resultaten geven. De viabiliteit van het sperma zou verbeterd zijn met 5,6%, de progressieve motiliteit met 34,7% en de motiliteitsindex van het sperma met 8,1% ten opzichte van het invriezen in vloeibare stikstof. Ook zou de 'directional freezing' (DF) methode zorgen voor een vermindering van het percentage abnormale acrosomen.

Het filteren van spermastalen doorheen glaswol wordt onder andere toegepast in de humane wetenschappen, en ook bij het verwerken van hengstensperma (Katila, 2001). Door het filteren wordt een betere spermakwaliteit verkregen na het ontdooien.

Omdat bij het collecteren van sperma van neushoorns na dekking kleine hoeveelheden leukocyten aanwezig kunnen zijn, zochten O'Brien en Roth (2000) naar een methode om deze cellen te verwijderen. Dit is bevorderlijk om de stalen te kunnen gebruiken voor IVF of om een ander vrouwtje te kunnen insemineren. O'Brien en Roth (2000) filterden de stalen na het ontdooien door glaswol.

Tabel 10: Het effect van het filteren van sperma van Sumatraanse neushoorns, gecollecteerd na dekking, doorheen glaswol bij het ontdooien (O'Brien en Roth, 2000). In de tabel worden gemiddelde waarden weergegeven van de spermakwaliteit  $\pm$  SD.

Sperma karakteristieken (aantal stalen)	Ongefilterd sperma	Sperma gefilterd doorheen glaswol bij het ontdooien
Voor het invriezen (n = 6)		
- Sperma motiliteitsindex	50,0 $\pm$ 2,9	/
- % levend sperma	81,5 $\pm$ 2,4	/
- % intacte acrosomen	87,0 $\pm$ 2,4	/
Na het ontdooien (n = 12)		
- % morfologisch normaal	0h	28,6 $\pm$ 0,8
- Sperma motiliteitsindex	0h	29,9 $\pm$ 2,5
	3h	60,9 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
	6h	50,0 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
- % leefbaar	0h	42,3 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
	3h	74,8 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
	6h	68,2 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>
- % intacte acrosomen	0h	70,9 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
	6h	86,7 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
		83,2 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Waarden met een verschillend superscript op dezelfde rij zijn significant verschillend.

Het filteren van de stalen bleek een effectieve methode te zijn om zo goed als alle leukocyten te verwijderen. Bovendien was de kwaliteit van de stalen hoger ten opzichte van deze die niet gefilterd werden (tabel 10). Of dit positief effect verkregen werd doordat componenten uit het cryoprotectans of leukocyten verwijderd werden, of doordat de glaswol spermacellen van een hogere kwaliteit selecteerde, weet men nog niet.

Het nadeel van het gebruik van glaswol was dat de stalen nog slechts de helft van het totaal aantal spermatozoa bevatten in vergelijking met de niet-behandelde stalen. Om deze reden is het gebruik van glaswol minder geschikt voor KI, waarbij grote aantallen spermatozoa vereist zijn (O'Brien en Roth, 2000).

## Gebruik van KI bij de neushoorn

De eerste succesvolle KI in een neushoorn werd gerapporteerd in 2007 in de Budapest Zoo. Er werd gebruik gemaakt van vers sperma, gecollecteerd van een mannetje dat op dezelfde plaats verbleef als het vrouwelijk dier. Door de gelimiteerde verdere toepassing van het verse sperma, besloten Hermes et al. (2009) het gebruik van diepvriessperma te evalueren voor KI in neushoorns.

### 6.6.6. Procedure vers sperma

Hildebrandt et al. (2007) beschrijven de KI procedure die ze hebben toegepast om een nullipare witte neushoorn drachtig te krijgen. Bij het vrouwtje werd de oestrus geïnduceerd. Per cyclus werd één keer geïnsemineerd met sperma dat een uur voor de procedure werd gecollecteerd met behulp van electro-ejaculatie. De inseminatiekatheter was 115 cm lang en zodanig ontwikkeld dat het hymen en de sterk geplooid cervix geen probleem vormden.

De steriele inseminatiekatheter werd eerst vaginaal ingebracht en begeleid door middel van digitale palpatie om voorbij het hymen, dat aanwezig kan zijn bij nullipare vrouwelijke dieren, te raken. Vervolgens werd de cervix transrectaal gepalpeerd en manueel gefixeerd terwijl de katheter doorheen de stevige, sterk getorteerde cervicale plooien werd gemanoeuvreed. De tip van de katheter werd in de uteriene hoorn waar de pre-ovulatoire follikel aanwezig was, geplaatst. De inseminatie met het voorverwarmde (37°C) en verdunde sperma werd opgevolgd met behulp van echografie.

Ook de monitoring van de dominante follikel gebeurde echografisch en werd gecombineerd met ovulatie inductie op de dag van de inseminatie. Voor de inductie van de ovulatie werd een synthetisch GnRH-analoog gebruikt, namelijk 4,2 mg desloreline acetaat (Ovuplant<sup>TM</sup>) (Hermes et al., 2007). Dit preparaat, dat ook gebruikt wordt voor ovulatie-inductie bij merries, is een implantaat dat subcutaan toegediend moet worden en zo vertraagd wordt vrijgegeven. Bij neushoorns is hiervoor een kleine incisie nodig caudoventraal van het oor om de dikke dermis te kunnen penetreren.

### **6.6.7. Procedure diepvriessperma**

In de studie van Hermes et al. (2009) voor het gebruik van diepvriessperma voor KI, werd het sperma afgenomen van een 35-36 jaar oude zuidelijke witte neushoorn door middel van electro-ejaculatie. De sperma-afname vond tweemaal plaats. De eerste keer werd een totaal volume van 56 ml verkregen in vijf fracties. De tweede keer werd 27,5 ml verkregen in drie fracties. Na afname werd het sperma meteen verlengd met op temperatuur gebracht Berliner Cryomedium in een 1:1 verhouding. Progressieve motiliteit, totale motiliteit en sperma concentratie werden bepaald en uitstrijkjes werden gemaakt voor een latere evaluatie van sperma morfologie en acrosoom integriteit.

Het sperma werd langzaam gekoeld over twee uur in een waterbad van 4°C. Na deze koeling werd het semen verdeeld over 8 ml en 2,5 ml buisjes en ingevroren. Uiteindelijk werden de buisjes bewaard in vloeibare stikstof gedurende 2-3 jaar vooraleer ze voor KI gebruikt werden.

Voor de inseminatie werd 16 ml van het verlengde semen ontdooid. Hiervoor werden twee stalen van 8 ml eerst 60 sec in de lucht gehouden bij kamertemperatuur (22-23°C). Nadien werden ze ondergedompeld in een warmwaterbad van 37°C voor 30 sec.

Er werd gebruik gemaakt van een speciaal ontwikkelde inseminatiepipet die de lange getorteerde cervix moest doorstaan. Onder echografische begeleiding werd de pipet tot in de uteriene hoorn gebracht waarop de ovulatieplaats zich bevond.

Het vrouwelijk dier dat gebruikt werd voor de studie, had nog maar net een kalf ter wereld gebracht. Ze werd na de partus continu opgevolgd door middel van progesteronbepaling in serum en feces. Gebaseerd op deze bepalingen en het verwachte tijdstip van involueren van de baarmoeder en het verschijnen van de 'veulenbronst', werd het vrouwtje 1-4 dagen voor de geplande KI echografisch gecontroleerd. 28 dagen postpartum was er bij dit dier een Graafse follikel aanwezig met een diameter van 34 mm. Ze werd geïnsemineerd volgens bovenstaande procedure met een spermacentratie van  $135 \times 10^6$  motiele cellen.

Jammer genoeg faalde deze inseminatie. Dit werd opgemerkt door het opnieuw bronstig worden van de neushoorn.

Een tweede poging werd ondernomen tijdens de derde postpartum bronst. Bij de echografische controle had ze een Graafse follikel van 26,5 mm. De inseminatie gebeurde dit keer met een concentratie van  $500 \times 10^6$  motiele cellen. Deze laatste was wel succesvol en resulteerde na 495 dagen in de geboorte van een gezond kalf.

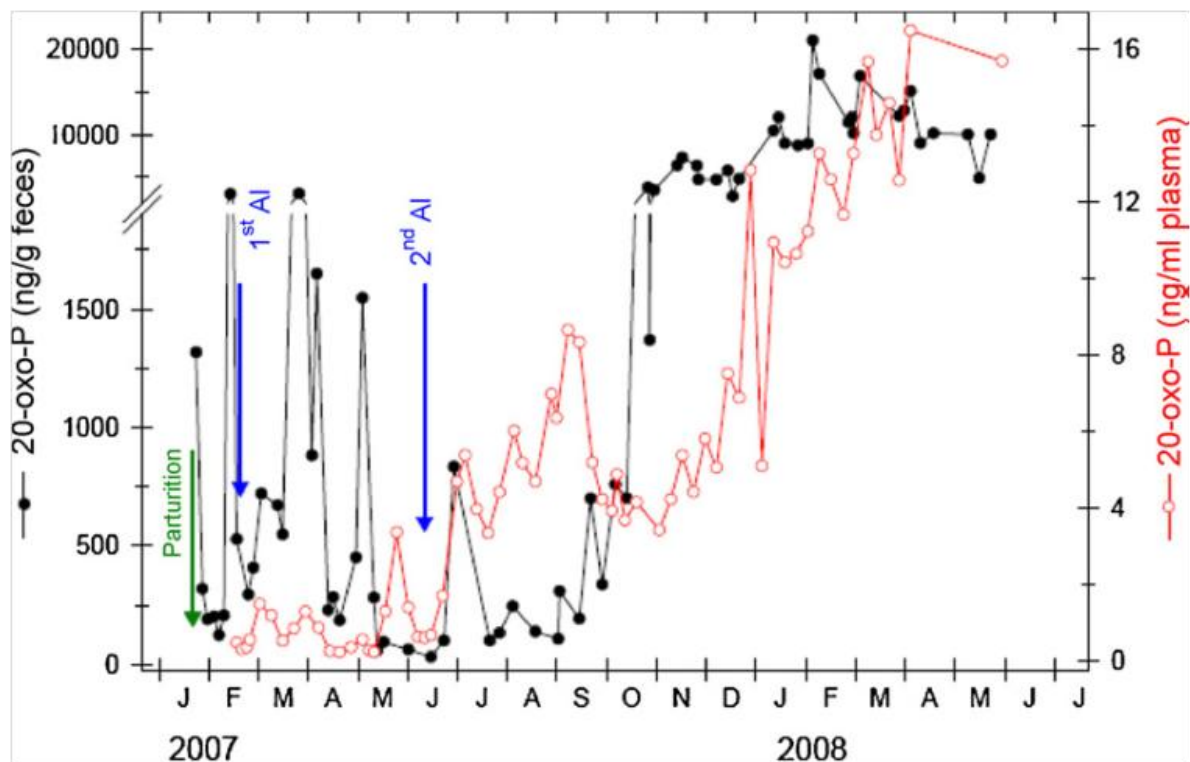


Fig.9: Grafische weergave van de opvolging van het vrouwelijk dier in de studie van Hermes et al. (2009) met behulp van de progesteronmetaboliet 20-oxo-P in bloed en feces.

Bij beide inseminaties werd hetzelfde GnRH-analoog gebruikt als in de studie van Hildebrandt et al. (2007). De toediening resulteerde telkens in een ovulatie binnen de 24 uur. Dit werd bevestigd door het verschijnen van een corpus haemorrhagicum van 35 mm en 34 mm bij de eerste en tweede KI respectievelijk.

## Afwijkingen aan het ♂ voortplantingsstelsel

### Penis

Zoals bij andere diersoorten kan paring of sperma-afname trauma aan de penis veroorzaken. Oppervlakkige letsels kunnen verholpen worden door topicaal zalf aan te brengen. Meer ernstige schaafwonden of letsels, kunnen oedeem veroorzaken wat de retractie van de penis verhindert (figuur 10). Doordat de penis dan voortdurend onbeschermd naar beneden hangt, neemt het oedeem toe en kunnen secundaire letsels optreden. Net zoals bij de hengst wordt de bloedtoevoer naar de glans

penis verstoord en is een agressieve therapie nodig om verdere/irreversibele letsels te vermijden. Het terugplaatsen van de penis is het eerste doel.



Fig.10: Oedeem en prolaps van de penis van een neushoorn (uit Hermes en Hildebrandt, 2011)

## Secundaire geslachtsklieren

Aandoeningen van de secundaire geslachtsklieren komen zelden voor. Prostaatcysten werden beschreven in een witte neushoorn. Cystevorming in de prostaat is waarschijnlijk pijnlijk en kon de oorzaak zijn voor het gebrekkige libido van de neushoorn.

## Testikels

Testiculaire fibrose, atrofie, trauma en neoplasie zijn afwijkingen die reeds beschreven werden in de mannelijke neushoorn.

Bij echografische evaluatie van het mannelijk voortplantingsstelsel werden, voornamelijk bij oudere dieren, kiemceldegeneratie en een verhoogde hoeveelheid fibrine in de interstitiële ruimte opgemerkt (figuur 11). Dit zonder enig effect op de fertiliteit. De associatie tussen de mate van fibrotische ontwikkelingen in het testiculaire parenchym en de leeftijd van de neushoorn, illustreerden dat dit testiculair

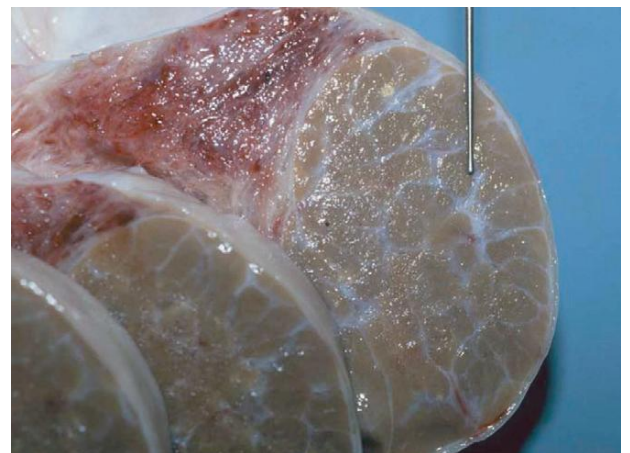


Fig. 11: Interstitiële fibrose (aangeduid met de probe) in een testikel van een oude Indische neushoorn (uit Hermes en Hildebrandt, 2011).

verouderingsproces op ongeveer 15-jarige leeftijd begint en steeds erger wordt bij het verouderen (Hermes et al., 2005).

In tegenstelling tot leeftijdsgerelateerde testiculaire fibrose, kunnen trauma en neoplasie wel de spermaproductie beïnvloeden en voor subfertiliteit of infertiliteit zorgen.

Portas et al. (2005) rapporteerden een neoplasie van het testiculair weefsel in een zuidelijke witte neushoorn die in gevangenschap werd gehouden. Histologisch werd deze neoplasie als een seminoma gekarakteriseerd. Seminoma's zijn de meest frequent optredende testiculaire neoplasieën bij paarden en dit voornamelijk bij cryptorchide hengsten (Brinsko, 1998). In neushoorns werden seminoma's nog niet eerder gerapporteerd (Portas et al., 2005). De afwezigheid van neoplastische processen die het urogenitaalstelsel aantasten bij mannelijke dieren, staat in contrast met de situatie bij vrouwelijke neushoorns gehouden in gevangenschap. Bij deze dieren komen neoplasieën aan het voortplantingsstelsel frequent voor. Het gaat dan vooral over uteriene leiomyomas.

Neoplastische processen en andere pathologische veranderingen van het voortplantingsstelsel van vrouwelijke neushoorns, worden toegeschreven aan een asymmetrisch verouderingsproces. Er is continu cyclische activiteit, maar er volgt geen conceptie (Hermes et al., 2004).

Bij hengsten worden seminoma's geassocieerd met trauma (Slusher, 1997). Dit zou ook het geval kunnen zijn bij neushoorns. De neushoorn beschreven door Portas et al. (2005), werd zes maanden vooraleer het seminoma met echografie werd vastgesteld, geïntroduceerd aan drie nieuwe vrouwtjes. Het zou dus mogelijk zijn dat het dier een trauma opliep aan de testikels bij de onderlinge bepaling van de hiërarchie in de nieuwe groep.

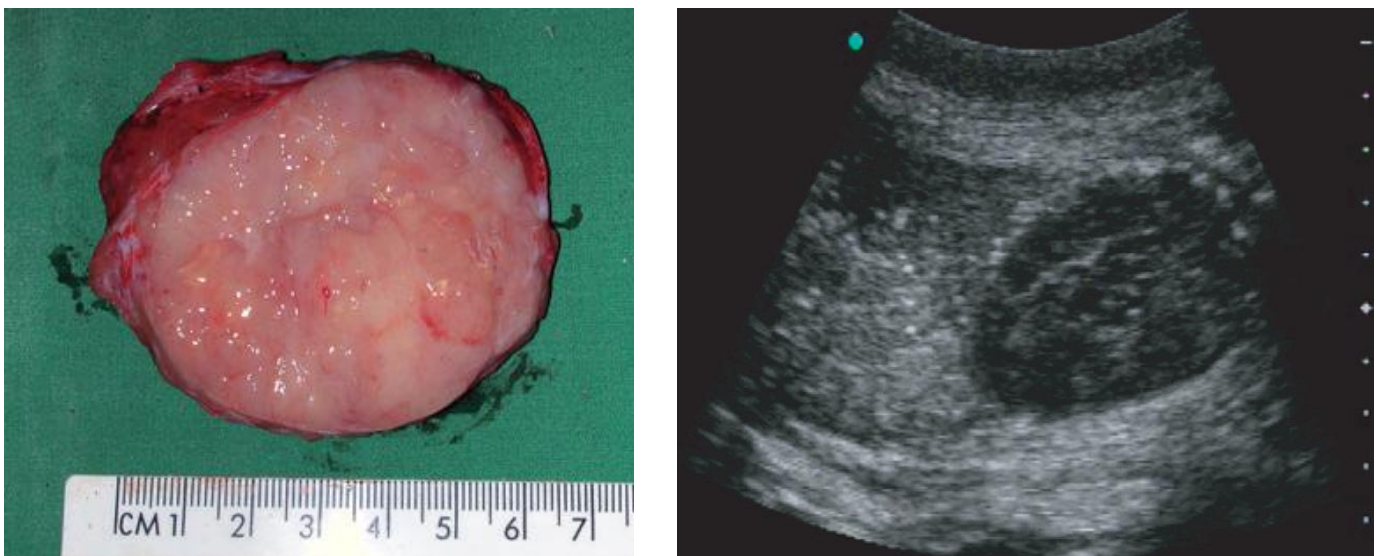


Fig. 12: Links: Macroscopisch uitzicht van een seminoma in een mannelijke zwarte neushoorn. Het oppervlak glinstert en puilt uit op doorsnede. Het normale testiculaire parenchym is gereduceerd tot een rand omheen de tumor (Portas et al., 2010). Rechts: Echografisch beeld van een seminoma in de testikel van een witte neushoorn (uit Hermes en Hildebrandt, 2011).

In 2010 rapporteerden Portas et al. een tweede geval van een seminoma, dit keer bij een in gevangenschap geboren en gehouden zwarte neushoorn. Bij een routine evaluatie van de reproductie capaciteit, werd door middel van echografie een massa vastgesteld ter hoogte van de testikels.

Histologisch onderzoek na het nemen van een biopsie ondersteunde de vooropgestelde diagnose van een seminoma.

Van deze neushoorn werd door middel van electro-ejaculatie sperma afgenomen en onderzocht, zowel van wanneer er nog geen seminoma aanwezig was, als wanneer dit wel het geval was (tabel 9). Uit de parameters bleek dat er bij dit dier sprake was van een gedaalde fertiliteit. Er werd een hemi-castratie uitgevoerd om te voorkomen dat er uitzaaiingen zouden optreden.

Analyse van het sperma 12 maanden na de operatie toonde nog steeds significant lagere waarden aan dan deze voordat het seminoma aanwezig was. Ondanks deze bevindingen heeft het mannetje nog wel gedekt, waaruit een succesvolle dracht voortkwam. Mogelijk is dat de staalname na de operatie niet representatief was of dat het dier fertiel blijft ondanks de lagere parameters van het sperma.

Tabel 11: Parameters van het sperma van een zwarte neushoorn; voor en tijdens de diagnose van een unilateraal seminoma en ook na de uitvoering van een hemi-castratie (Portas et al., 2010).

Parameter ejaculaat	Gezond (n = 1)	Met seminoma (n = 2)	Na hemi-castratie (n = 1)
Volume (ml)	47	9,5	16
Concentratie sperma (10 <sup>6</sup> /ml)	70	225	6
Totale motiliteit (%)	90	57	10
Progressieve motiliteit	85	38	0
Intact sperma	75	30	5

Het eerste geval van een seminoma in de witte neushoorn werd geassocieerd met trauma. De zwarte neushoorn werd reeds gedurende 18 maanden vooraleer de diagnose gesteld werd, solitair gehuisvest. Wel werd een gelokaliseerde zwelling en een mogelijke penetrerende wonde opgemerkt in de linker inguinaal regio 10 maanden vooraleer het seminoma werd vastgesteld. Ook hier is dus trauma een mogelijke oorzaak voor het ontstaan van dit gezwel.

In beide gevallen nam het seminoma zeer snel in grootte toe. Dit is een typisch kenmerk van deze neoplasieën dat ook gezien wordt bij paarden (Brinsko, 1998).

Ook aan de epididymis kunnen afwijkingen voorkomen. Hermes en Hildebrandt (2011) beschrijven het bestaan van epididymale cysten, als afwijking aan de afvoergangen bij Sumatraanse en witte neushoorns. Onderstaand echografiebeeld (figuur 13) toont een dergelijke cyste bij een witte neushoorn. De met helder vocht gevulde structuren, waarvan de dimensies kunnen variëren van 1 tot 10 cm, beïnvloeden de spermakwaliteit. Ejaculaten verkregen van stieren met dergelijke afwijkingen, zijn ofwel aspermatisch ofwel van lage kwaliteit. De oorzaak van deze cysten is nog onbekend. Een transcutane aspiratie van het vocht kan ervoor zorgen dat het spermatransport weer door kan gaan en de fertiliteit toeneemt.

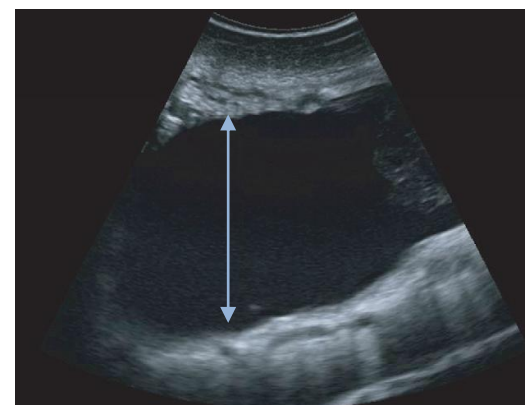


Fig. 13: Cyste (aangeduid met de dubbele pijl) van de epididymis in een onvruchtbare witte neushoorn (uit Hermes en Hildebrandt, 2011).



## BESPREKING

---

Hoewel we jammer genoeg door overmacht niet in onze proefopzet zijn geslaagd om echte neushoorns in hun fokprogramma te volgen, kunnen we uit de literatuur toch heel wat concluderen en onze bedenkingen hierbij maken.

Het is duidelijk dat verschillende zaken een rol spelen in de voortplantingsproblematiek bij neushoorns in gevangenschap. Het lijkt alsof onderzoekers zich in de beginjaren vooral op het vrouwelijk dier gericht hebben om de problemen te verklaren. De vrouwelijke neushoorns bekleeden een grote rol, maar ook het mannelijk dier en de niet te onderschatten managements- en omgevingsinvloeden dragen in belangrijke mate bij tot het tijdig drachtig krijgen van de vrouwtjes.

Wanneer stieren samen gehouden worden is vooral hiërarchie belangrijk. Het feit dat subdominante mannelijke dieren een lage tot gemiddelde spermakwaliteit hebben kan verholpen worden door ze alleen of in kleinere aantallen bij vrouwelijke dieren te plaatsen. De aanwezigheid van een vrouwelijk dier bleek zelfs niet essentieel om een kwaliteitsvol ejaculaat te verkrijgen.

Een betere kennis van de territoriale behoeften van mannelijke neushoorns in relatie tot andere mannelijke en vrouwelijke neushoorns, is zeer belangrijk om betere resultaten te verkrijgen bij de voortplanting in gevangenschap. Testosteronbepalingen kunnen een idee geven over de dominantie van bepaald dieren en daarmee ook over het libido. Studies zouden op grotere schaal toegepast moeten worden om de testosteronconcentraties van mannelijke neushoorns beter te kunnen analyseren en om ze te linken aan het libido en de fertiliteit van de dieren.

Een goede observatie van het gedrag van de neushoorns kan uiteraard ook al veel zeggen over het libido van de stier en over de cycliciteit van de vrouwtjes.

In tegenstelling tot de vrouwelijke neushoorns, komen pathologieën aan het geslachtsstelsel van de mannelijke dieren die in gevangenschap gehouden worden relatief weinig voor. Fibrosering van het testiculaire weefsel wordt frequent gerapporteerd, maar de invloed ervan op de fertiliteit is nihil. Dit is toch wel een opmerkelijke bevinding, vermits het verouderen van de voortplantingsorganen bij onder andere hengsten gepaard gaat met een gedaalde hoeveelheid sperma en een verminderd libido. Bij neushoorns ouder dan 30 jaar daarentegen, werd juist een hogere spermakwaliteit teruggevonden.

In tegenstelling tot de fibrosering, kunnen testiculaire neoplasieën de spermaproductie wel negatief beïnvloeden. Zowel bij een witte als bij een zwarte neushoorn werd reeds een seminoma teruggevonden.

Het voortplantingspotentieel van mannelijke dieren kan worden nagegaan door de spermakwaliteit na afname te analyseren. Na verschillende methoden van sperma-afname te hebben vergeleken, kan geconcludeerd worden dat electro-ejaculatie in combinatie met rectale en/of peniele stimulatie, de beste en meest betrouwbare resultaten geeft. Het nadeel is dat de stieren hiervoor steeds onder anesthesie gebracht moeten worden.

Anders dan bij hengsten, is het gebruik van een kunstvagina eerder af te raden. Eerst en vooral zorgt het gewicht en de grootte van de penis er al voor dat het niet eenvoudig is om de kunstvagina te hanteren. De caverneuze laterale projecties die op de penis aanwezig zijn maken het goed