

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2015 - 2016

**IJZERSTAPELINGSZIEKTE BIJ BROWSENDE NEUSHOORNS IN
GEVANGENSCHAP**

door

Maarten RATHE

Promotoren: Prof. dr. Ir. Geert Janssens
dr. Jana Pauwels

Thesis in het kader
van de masterproef

© 2016 *Maarten Rathe*

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.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2015 - 2016

**IJZERSTAPELINGSZIEKTE BIJ BROWSENDE NEUSHOORNS IN
GEVANGENSCHAP**

door

Maarten RATHE

Promotoren: Prof. dr. Ir. Geert Janssens
dr. Jana Pauwels

Thesis in het kader
van de masterproef

© 2016 *Maarten Rathe*

VOORWOORD

Eerst en vooral wil ik Prof. dr. Geert Janssens bedanken voor het aanbieden van dit boeiende en actuele onderwerp, en natuurlijk voor de bijhorende zoobezoekjes. Ook Dr. Jana Pauwels verdient een welgemeende *dankie* om, al dan niet vanuit Zuid-Afrika, steeds de literatuurstudie na te lezen en bij te sturen, voorafgegaan door de nodig duwtjes. Ten slotte een welgemeende dankuwel aan de verzorgers en dierenartsen van Diergaarde Blijdorp, De Beekse Bergen, Planckendael en Chester Zoo voor de leuke samenwerking!

INHOUDSOPGAVE

| | |
|---|----|
| DEEL I - LITERATUURSTUDIE | 3 |
| 1. Samenvatting | 3 |
| 2. Inleiding | 4 |
| 3. Conservatie en biologie | 5 |
| 3.1. De neushoorn, een bedreigde diersoort | 5 |
| 3.2. Fysiologie | 6 |
| 3.2.1. Grazers versus browsers | 6 |
| 3.2.2. Gras versus browse | 8 |
| 3.3. Het dieet van de zwarte en Sumatraanse neushoorns | 8 |
| 3.3.1. Het dieet van de zwarte en Sumatraanse neushoorns in gevangenschap | 8 |
| 3.3.2. Het dieet van de zwarte en Sumatraanse neushoorns in het wild | 9 |
| 3.3.3. Ijzer- en kopergehalten in het dieet in het wild versus het dieet in gevangenschap | 9 |
| 3.3.4. Tannines om de ijzeropname te verlagen | 11 |
| 4. Ijzerstapelingsziekte | 12 |
| 4.1. Voorkomen | 12 |
| 4.2. Hemosiderose en hemochromatose | 13 |
| 4.3. Fysiologie van de ijzerstofwisseling | 14 |
| 4.4. Oorzaken | 17 |
| 4.5. Pathofysiologie | 20 |
| 4.6. Diagnose | 22 |
| 4.7. Preventie en behandeling | 23 |
| 4.7.1. Preventie | 23 |
| 4.7.2. Behandeling | 24 |
| 4.7.3. Opvolging | 25 |
| 5. Andere frequent voorkomende aandoeningen bij de zwarte neushoorn, een overzicht | 25 |
| 5.1. Hemolytisch syndroom | 25 |
| 5.2. Mucocutaan ulceratief syndroom | 26 |
| 5.3. Toxische hepatopathie | 27 |
| 5.4. Leukoencephalomalacie | 28 |
| 6. Discussie | 29 |
| DEEL II - ONDERZOEK | 31 |
| 1. Samenvatting | 31 |

| | |
|--|----|
| 2. Inleiding | 31 |
| 3. Materialen en methoden | 32 |
| 3.1. Verzamelen van de stalen | 32 |
| 3.2. Eigenschappen van de stalen | 32 |
| 3.2.1. Stalen zwarte neushoorns Blijdorp | 32 |
| 3.2.2. Stalen zwarte neushoorns Chester | 33 |
| 3.2.3. Stalen Indische neushoorns Planckendael | 33 |
| 3.2.4. Stalen witte neushoorns Beekse Bergen | 33 |
| 3.3. Verwerking van de stalen | 33 |
| 3.3.1. Bloedstalen | 33 |
| 3.3.2. Voederstalen | 34 |
| 3.3.3. Meststalen | 34 |
| 3.3.4. Statistische analyse | 34 |
| 4. Resultaten | 34 |
| 4.1. Serum- en plasmastalen | 34 |
| 4.1.1. Verschillen tussen dierentuinen en literatuurdata | 34 |
| 4.2. Voeder- en meststalen | 36 |
| 5. Bespreking | 36 |
| Deel III - Referenties | 38 |

DEEL I - LITERATUURSTUDIE

1. SAMENVATTING

De neushoorn is reeds jaren een bedreigde diersoort, voornamelijk door onophoudelijke stroperij voor hun hoorn (Amin et al., 2006). Sommige auteurs (Emslie & Knight, 2014) voorspellen dat de neushoorns uitgestorven zullen zijn tegen 2020 als de stroperij het huidige tempo blijft aanhouden. Om het behoud van de neushoorns te verzekeren worden ze in zoos gehouden en gekweekt. Ondanks deze maatregel krijgen de dieren in gevangenschap te maken met verschillende aandoeningen waaronder ijzerstapelingsziekte. Ijzerstapelingsziekte komt voor bij veel verschillende diersoorten zoals vogels, antilopen en de browsende zwarte (*Diceros bicornis*) en Sumatraanse (*Dicerorhinus sumatrensis*) neushoorns (Klasing et al., 2012). De ziekte wordt gekenmerkt door een overmatige stapeling van ijzer in verschillende organen waaronder de milt en de lever met orgaanschade en -dysfunctie tot gevolg (Paglia & Tsu, 2012). De voornaamste symptomen zijn lethargie en een verminderde eetlust (Mylniczenko et al. 2012). Bij de meeste aangetaste diersoorten komt de aandoening uitsluitend voor in gevangenschap (Paglia & Tsu, 2012). Alleen browsende neushoornsoorten worden aangetast, de grazende neushoorns niet (Candra et al., 2012). Grazers en browsers vertonen belangrijke fysiologische verschillen in het verteren van respectievelijk grassen, en takken en bladeren van bomen en struiken (Hofmann, 1989). Browsers hebben in tegenstelling tot grazers onder andere mechanismen ontwikkeld om tannines in hun voeder onschadelijk te maken (Clauss et al., 2005a). Een verschil in ijzermetabolisme tussen browsers en grazers werd nog niet gevonden.

Het onderliggend mechanisme van ijzerstapelingsziekte is tot nu toe onbekend. Enerzijds kan een verhoogde opname of verminderde uitscheiding van ijzer, zoals een te hoog ijzergehalte in het voeder in gevangenschap aan de basis van de ziekte liggen (Candra et al., 2012). Het ijzergehalte van het voeder in gevangenschap is doorgaans veel hoger dan in het wild (Clauss & Hatt, 2006). Anderzijds kan een verminderde vrijstelling uit organen door een metabole stoornis, zoals een kopertekort de ijzerstapelingsziekte veroorzaken. Het ijzer- en kopermetabolisme zijn sterk afhankelijk van elkaar (Aigner et al., 2008). De ijzerstofwisseling bestaat uit specifieke eiwitten voor de opname van ijzer uit de darm (divalent metal transporter 1), het transport in het bloed (transferrine) en de vrijstelling van ijzer uit organen (ferroportine) (Klasing et al., 2012). De lever is het belangrijkste ijzerregulerende orgaan door de productie van hepcidine. Daarnaast wordt ook insulineresistentie (Nielsen et al., 2012) als mogelijke oorzaak naar voor geschoven. Ter preventie van ijzerstapelingsziekte is het beperken van ijzer in het voeder momenteel de belangrijkste maatregel (Clauss & Paglia, 2012). Een genezende behandeling is er nog niet. Momenteel wordt het ijzergehalte in het bloed bij gevorderde gevallen onder controle gehouden met aderlatingen (Clauss & Paglia, 2012) en wordt er getest met chelatietherapie om de opname van ijzer te verlagen en de uitscheiding te verhogen (Sullivan et al., 2014). Om de opname te beperken wordt ook met het toevoegen van tannine aan het voeder geëxperimenteerd. Ten slotte heerst een sterk vermoeden dat ijzerstapelingsziekte geassocieerd is met andere veel voorkomende aandoeningen zoals het hemolytisch syndroom, het mucocutaan ulceratief syndroom, toxische hepatopathie (Paglia et al., 2001) en leukoencefalomalacie (Mylniczenko et al. 2012).

2. INLEIDING

Neushoorns worden reeds jarenlang sterk bedreigd door stropers, voornamelijk voor hun schijnbaar geneeskrachtige hoorn. Om het uitsterven van deze bijzondere dieren te voorkomen worden ze wereldwijd in gevangenschap gehouden. Deze beschermende maatregelen hebben ook een keerzijde waardoor het dilemma rijst of het nuttig is deze dieren in gevangenschap te houden (Candra et al., 2012). Browsende neushoornsoorten, meerbepaald de zwarte (*Diceros bicornis*) en Sumatraanse neushoorns (*Dicerorhinus sumatrensis*) worden geteisterd door verscheidene ziekten waaronder ijzerstapelingsziekte. Ijzerstapelingsziekte is een aandoening waarbij ijzer overmatig opgestapeld wordt in verschillende organen met orgaanschade tot gevolg (Paglia & Tsu, 2012). De dieren lijden aan lethargie en een verminderde eetlust en symptomen van ziekten zoals het mucocutaan ulceratief syndroom die eraan gelikt kunnen zijn (Mylniczenko et al. 2012). Uiteindelijk kunnen dieren sterven (Mylniczenko et al. 2012).

De ziekte wordt uitsluitend beschreven bij dieren in gevangenschap (Paglia & Tsu, 2012). Veel hypothesen werden reeds getest maar nog geen enkele werd definitief bevestigd. De hypothese die in de meeste onderzoeken naar voor geschoven wordt is een overmaat aan ijzer in het dieet in gevangenschap (Candra et al., 2012). Het is echter onmogelijk om het ijzerarme dieet in het wild met meer dan 190 (uitheemse) soorten te voederen in gevangenschap (Steuer et al, 2010). Daarom worden eerder grassen en pellets gevoederd die meer ijzer bevatten (Clauss & Hatt, 2006). Andere mogelijke oorzaken zijn stress, een tekort aan koper en insulineresistentie (Aigner et al., 2008). Het is voor deze diersoort van groot belang de oorzaak en het onderliggend mechanisme van de ziekte te ontrafelen. Zowel voor het behoud van de diersoort in het wild als in gevangenschap. Op die manier kan er vervolgens gezocht worden naar betere preventieve maatregelen en een behandeling. De huidige maatregelen hebben immers verschillende nadelen.

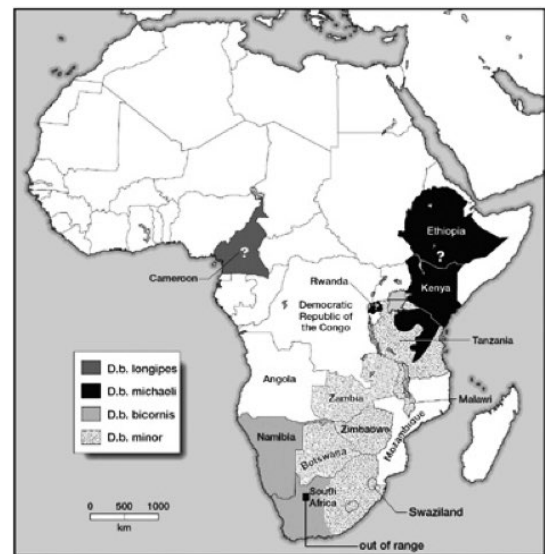
3. CONSERVATIE EN BIOLOGIE

3.1. DE NEUSHOORN, EEN BEDREIGDE DIERSOORT

Onophoudelijke stroperij heeft van de neushoorn een sterk bedreigde soort gemaakt. De hoorn heeft een reputatie als geneesmiddel tegen flauwtes, epilepsie, koorts, als afrodisiacum (Amin et al., 2006) en wordt gebruikt voor het vervaardigen van handvaten van jambiya dolken in Yemen (Emslie & Brooks, 1999). De geneeskundige werking werd nooit bewezen maar in ratten zou een licht koortsverlagend effect waargenomen zijn (But et al., 1990). Zuid-Korea, China en Taiwan zijn momenteel de grootste afzetmarkten voor de hoorn (Amin et al., 2006). De stroperij is vooral hoog in tijden van oorlog in streken waar armoede heerst (Amin et al., 2006). De hoorn wordt zelfs opgeslagen als speculatiemiddel (Emslie & Brooks, 1999). Sommigen menen dat de stroperij verlaagd kan worden door de handel in hoorn te legaliseren. Neushoorns hoeven immers niet gedood te worden om de hoorn af te zagen en de hoorn groeit achteraf weer terug. Door een groter en legaal aanbod en het feit dat de neushoorn minder zeldzaam wordt zullen de prijzen op de zwarte markt dalen en wordt de hoorn voor velen minder waardevol. De opbrengst van de hoornverkoop kan gebruikt worden om de lokale meestal arme bevolking en de conservatieparken te ondersteunen (Amin et al., 2006). Het bestrijden van stropers alleen al kost immers handenvol geld (Emslie & Brooks, 1999). Ondanks een legalisering zou hoorn dat op illegale wijze verkregen is nog steeds "witgewassen" kunnen worden. Niet iedereen is te vinden voor een legalisering. Een andere wijze om conservatie te financieren gebeurt door fondsenwerving en in sommige privéparken door trofeejacht (Amin et al., 2006). Met dit geld worden de dieren beschermd door onder andere de lokale bevolking bewust te maken (Amin et al., 2006) en actieve bescherming te bieden door het inzetten van rangers, vliegtuigen en zelfs drones (<http://www.sciencedaily.com>, 20/2/2016).

Gezien sommige neushoornsoorten met uitsterven bedreigd zijn moet er een constructieve oplossing gevonden worden. Emslie & Knight (2014) voorspellen het uitsterven van neushoorns in 2020 als de huidige stijging van stroperij zich voortzet. In het begin van de 20ste eeuw werden er wereldwijd nog meer dan 500.000 neushoorns geteld, op dit moment zijn er nog slechts 29.000 in het wild (<http://www.iucnredlist.org>, 20/2/2016). De Noordelijke witte neushoorn (*Ceratotherium simum cottoni*) is met amper 1 mannelijk en 2 vrouwelijke dieren de ergst bedreigde soort. Zij worden dag en nacht beschermd in het Ol Pejeta park in Kenia (Vigne, 2015).

De zwarte neushoorn (*Diceros bicornis*) bestaat momenteel uit 3 subspecies, de Zuid-Centrale (*D. b. minor*), Zuid-Westelijke (*D. b. bicornis*) en de Oostelijke zwarte neushoorn (*D. b. michaeli*). Een vierde subspecies, de Westelijke zwarte neushoorn of *Diceros bicornis longipes* is sinds 2006 uitgestorven. De zwarte neushoorn heeft zijn terrein zien slinken naar landen in het westen en zuiden van Afrika, voornamelijk Zuid-Afrika, Namibië, Kenia en Zimbabwe (Figuur 1). Samen herbergen deze landen meer dan 90 procent (Amin et al., 2006) van de neushoornpopulatie. Een minderheid bevindt zich in het zuiden van Angola, Botswana, Mozambique en Tanzania (<http://www.iucnredlist.org>, 20/2/2016).



Figuur 1. Geografisch voorkomen van de 4 subspecies van de zwarte neushoorn in Afrika. Uit Amin et al., 2006.

Tabel 1. Een overzicht van de huidige neushoornpopulaties in het wild en gevangenschap (Emslie & Knight, 2014; <http://www.iucnredlist.org>, 20/2/2016; ZIMS; Foose & Wiese, 2006.)

| | Wild en safariparken | Gevangenschap | Status en evolutie |
|---|-----------------------|---------------|-------------------------------------|
| Zuid-Centrale Zwarte neushoorn (<i>Diceros bicornis minor</i>) | 2323 | 31 | Ernstig bedreigd, ↑ |
| Zuid-Westelijke Zwarte neushoorn (<i>Diceros bicornis bicornis</i>) | 1950 | 5 | Kwetsbaar, ↑ |
| Oostelijke Zwarte neushoorn (<i>Diceros bicornis michaeli</i>) | 800 | 138 | Ernstig bedreigd, ↑ |
| Noordelijke witte neushoorn (<i>Ceratotherium simum cottoni</i>) | 3 in Ol Pejeta, Kenia | 0 | Ernstig bedreigd, ↓ |
| Zuidelijke witte neushoorn (<i>Ceratotherium simum simum</i>) | 20.000 | 750 | Bijna bedreigd, ↑ |
| Sumatraanse neushoorn (<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>) | 220-275 | 20 | Ernstig bedreigd, ↓ |
| Javaanse neushoorn (<i>Rhinoceros sondaicus</i>) | 40-60 | 0 | Ernstig bedreigd, evolutie onbekend |
| Indische neushoorn (<i>Rhinoceros unicornis</i>) | 2575 | 187 | Kwetsbaar, ↑ |

In tabel 1 worden de huidige populatiegrootte en conservatiestatus van de verschillende neushoornsoorten en subspecies weergegeven. De status wordt bepaald aan de hand van een reeks criteria. De status “ernstig bedreigd” wil zeggen dat de populatie de laatste 3 generaties met minstens 80 procent is afgenomen. “Kwetsbaar” wil zeggen dat de populatie gedurende de laatste 5 jaar niet meer dan 1000 dieren telde (<http://www.iucnredlist.org>, 20/2/2016). “Bijna bedreigd” wil zeggen dat de stroperij recent toegenomen is en er een daling is in populatiegrootte van maximum 30 procent over 3 generaties heen.

3.2. FYSIOLOGIE

3.2.1. Grazers versus browsers



Figuur 2. Grazende Indische neushoorn
Bron: <http://www.nationalgeographic.com>
10/12/2015



Figuur 3. Browsende zwarte neushoorn
Bron: <http://www.safaribookings.com>
10/12/2015

Herbivoren kunnen volgens hun natuurlijke dieet en spijsverteringsstelsel ingedeeld worden in browsers, grazers en intermediate feeders (Hofmann, 1989). Grazers zoals schapen (*Ovis aries*), rundvee, de buffel (*Syncerus caffer*) en de witte neushoorn (*Ceratotherium simum*) voeden zich hoofdzakelijk met grassen. Browsers waaronder de giraffe (*Giraffa camelopardalis*), de eland (*Alces Alces*) en de zwarte neushoorn voeden zich onder andere met vruchten en takken en bladeren van bomen en struiken (Hofmann, 1989). Met de termen "browse" en "concentrate selector" wordt gewezen op het selecteergedrag. Een browser selecteert namelijk voor geconcentreerd voer wat betreft energie en eiwitten zoals vruchten en knoppen (Hofmann, 1989; Boufennara et al., 2012). Bij de „intermediate feeders” tenslotte, behoort een combinatie van grassen en ruwere plantendelen tot hun natuurlijke dieet. De geit (*Capra hircus*) en de impala (*Aepyceros melampus*) behoren tot deze categorie (Hofmann, 1989).

Ook neushoorns kunnen op die manier opgedeeld worden. Onder de grazers rekenen we onder andere de noordelijke en zuidelijke witte neushoorns. De zwarte en Sumatraanse neushoorns zijn strikte browsers. De Indische neushoorn, een intermediate feeder is een speciaal geval gezien deze neushoorn oorspronkelijk een browser was die relatief recent is overgeschakeld naar een dieet dat afhankelijk van het seizoen voor meer dan 75 procent uit grassen kan bestaan (Laurie, 1982; Clauss et al., 2005a; Clauss et al., 2005b). Naast grassen voedt deze soort zich met browse en vruchten in het wild (Clauss & Hatt, 2006). De witte neushoorn voedt zich met minstens 13 verschillende soorten grassen met een voorkeur voor soorten met veel en lange vezels (noordelijke witte neushoorn), of kort gras rijk aan nutriënten (zuidelijke witte neushoorn) (Kiefer et al., 2003; Groves et al., 2010) en leeft voornamelijk in grasland en savannes (Waldrum et al., 2008). De zwarte neushoorn (*Diceros bicornis*) selecteert takken en bladeren van meer dan 190 verschillende planten en een klein aandeel (meestal geschat op minder dan 5 procent maar in sommige parken tot bijna 20 procent van het dieet (Parker et al., 2009)) grassen (Goddard, 1968) wat het moeilijk maakt om een uitgebalanceerd dieet te voorzien in gevangenschap (Steuer et al., 2010). De zwarte neushoorn gedijt in verscheidene habitats waar kruiden en houtige gewassen voorkomen waaronder (semi-) woestijnen, beboste savannes en wouden (Amin et al., 2006).

Neushoorns zijn net zoals paarden monogastrische dikkedarmfermenteerders (Owen-Smith, 1998) en behoren bijgevolg niet tot de herkauwende herbivoren (Bian et al., 2013). Microbiële fermentatie van plantenvezels in de dikke darm vormt de voornaamste energiebron van het lichaam (Clauss & Hatt, 2006). In tegenstelling tot paarden hebben witte neushoorns een weinig ontwikkelde blinde darm, maar wel een uitermate ontwikkeld colon dat dienst doet als fermentatievat. Functioneel zou het colon dus het belangrijkste fermentatievat zijn dat bijgestaan wordt door de blinde darm. Bij het paard is net het omgekeerde waar (Endo et al., 1999).

Er is ook een verschil in morfologie van de tanden en lippen. De molaren van de zwarte neushoorn hebben een 2-ledig oppervlak met een snijdende werking aan de labiale zijde en een malende functie aan de tongzijde waardoor het kauwen uit twee fasen bestaat. Zwarte neushoorns hebben geen snijtanden. Hun lippen zijn relatief smal en gemaakt om bladeren en twijgen te grijpen. Deze bouw maakt grazen minder evident (Clemens & Maloiy, 1982). De hypsodonte tanden van de witte neushoorn hebben meer cement en een vlak malend oppervlak dat lijkt op elkaar gepakte scheermesjes (Steuer et al., 2010). In combinatie met hun wijde lippen zijn witte neushoorns in staat grassen kort af te maaien (Waldrum et al., 2008). De beschreven tandmorfologie is typisch voor browsers en grazers respectievelijk (Owen-Smith, 1998). De tandenmorfologie van de Indische neushoorn heeft kenmerken van zowel browsers als grazers (Owen-Smith, 1998).



Figuur 4. Links: zwarte neushoorn met smalle lippen. Rechts: witte neushoorn met brede lippen
Bron: <http://www.rhinoresourcecenter.com> 10/12/2015

3.2.2. Gras versus browse

Onder de term “grassen” worden éénzaadlobbige of monocotyledone gewassen verstaan, waartoe ook granen behoren. Browse daarentegen bestaat voornamelijk uit tweezaadlobbige of dicotyledone planten. Tot deze laatste groep behoren onder andere verschillende leguminosen zoals bonen en erwten, maar ook bomen zoals de eik. Afhankelijk van de plantensoort worden takken en bladeren geconsumeerd (Shiple, 1999; Boufennara et al., 2012). Grassen vertonen een homogener groei in vergelijking met browse (Shiple, 1999). Bij deze laatste zijn de vrucht, stam en bladeren immers veel gemakkelijker te onderscheiden (Jarman, 1974). Grassen hebben een dikke celwand waarin zich koolhydraten en lignine onder de vorm van cellulose, en weinig secundaire metabolieten zoals tannines bevinden. Browse op zijn beurt heeft doorgaans een dunnere celwand maar deze celwand is rijker aan secundaire metabolieten waardoor het moeilijker te verteren is (Hofmann, 1989; Bennett & Wallsgrove, 1994). De dikke celwand van grassen vereist meer energie om te verwerken dan de zwakkere celwand van bladeren van browse: er moet immers meer gekauwd worden (Shiple, 1999). Tenslotte groeien grassen dicht tegen de grond terwijl browse zich op verschillende hoogten kan bevinden, zoals struiken en takken van bomen (Claus et al., 2008). Het gebit van grazers en browsers respectievelijk is hieraan aangepast (Owen-Smith, 1998).

3.3. HET DIEET VAN DE ZWARTE EN SUMATRAANSE NEUSHOORNS

3.3.1. Het dieet van de zwarte en Sumatraanse neushoorns in gevangenschap

Het dieet in gevangenschap is veel beperkter in vergelijking met het dieet van in het wild levende dieren en varieert van zoo tot zoo. Het voeder van de Sumatraanse neushoorn bestaat meestal uit luzernehooi en pellets die een hogere hoeveelheid ijzer bevatten in vergelijking met het dieet in het wild (Candra et al., 2012). Men heeft de gewoonte in zoos om meer gepelleteerd voeder te supplementeren bij browsende dan bij grazende neushoorns. Hier is echter geen wetenschappelijke basis voor en kan zelfs gezondheidsproblemen teweeg brengen doordat het dieet niet uitgebalanceerd is (Claus & Hatt, 2006).

3.3.2. Het dieet van de zwarte en Sumatraanse neushoorns in het wild

Het exacte dieet in het wild is door de grote variatie aan gewassen en variatie in welk deel van elk gewas ze eten zeer moeilijk te achterhalen. Bij dieren die in het wild of vrij in een opvangcentrum leven en de kans hebben om hun browse zelf te selecteren werd gezien dat de keuze aan gewassen varieert doorheen het jaar (Candra et al., 2012).

3.3.3. Ijzer- en kopergehalten in het dieet in het wild versus het dieet in gevangenschap

Zowel de ijzer- als kopergehalten in het voeder zijn van belang gezien het ijzermetabolisme sterk afhankelijk is van koperhoudende ferroxidasen zoals ceruloplasmine en hephestine. Deze ferroxidasen zorgen voor de omzetting van ijzer van de ferro- (Fe^{2+}) naar de ferri- (Fe^{3+}) vorm om de vrijstelling van ijzer door cellen mogelijk te maken (Aigner et al., 2008).

De ideale ijzer- en koperwaarden van het voeder zijn voor neushoorns tot nog toe niet bekend. Ze worden geschat aan de hand van de behoefte bij paarden, gezien ze zoals hoger vermeld fysiologisch sterk op elkaar lijken. Als ijzergehalte wordt 40 tot 70 mg/kg op droge stofbasis nagestreefd bij paarden en wat koper betreft 10 mg/kg op droge stof basis (Clauss & Hatt, 2006).

In gevangenschap

Het dieet van browsende neushoorns in gevangenschap bevat meestal een overmaat aan ijzer (Clauss et al., 2012). In tabel 2 worden de ijzer- en kopergehalten van enkele gewassen die in gevangenschap geconsumeerd worden weergegeven. De ijzergehalten van hooi en grassen kunnen sterk variëren onder invloed van de bodemkwaliteit en het gebruik van stikstof- of fosfaatbemesters (Mayland & Sneva, 1983; Adams, 1975; Clauss et al., 2012). Het gebruik van stikstof of fosfaatbemesters zorgt voor een stijging van het ijzergehalte in planten. De relatieve biologische beschikbaarheid van ijzer afkomstig uit aarde is laag maar het ijzer kan oplossen in de maag en vervolgens geresorbeerd worden in de darm (Clauss et al., 2012). De relatieve biologische beschikbaarheid is een maat voor de resorptie van een stof via een bepaalde toedieningsweg. De oplosbaarheid en bijgevolg ook de biologische beschikbaarheid van ijzer kunnen verhoogd worden door blootstelling aan een zuur milieu bij het inkuilen. Ijzer is in de bodem meestal aanwezig onder de driewaardige of ferri-vorm (Fe^{3+}) in onoplosbare complexen. Door blootstelling aan een zuur milieu kan het ferri-ijzer gereduceerd worden tot het beter oplosbare tweewaardige of ferro-ijzer (Fe^{2+}) met een hogere intestinale opname tot gevolg (Hansen & Spears, 2009). Ook de wijze waarop de gewassen gekweekt en geoogst worden kunnen een grote invloed hebben op de ijzergehalten (Clauss et al., 2012). Daarenboven kan de relatieve biologische beschikbaarheid verlaagd worden door de aanwezigheid van ijzerbinders zoals fytaten en polyfenolen (Clauss et al., 2012).

Tabel 2. Ijzer- en kopergehalten op droge stof basis van enkele gewassen uit het dieet in gevangenschap. Naar Adams, 1975.-1

| | Fe (mg/kg) min - max (gemiddeld) | Cu (mg/kg) min - max (gemiddeld) |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Leguminosen | 41,0 - 800,0 (221,7) | 2,0 - 214,0 (13,1) |
| Grassen | 32,0 - 1200,0 (76,4) | 2,0 - 69,0 (12,9) |
| Gedroogde bietenpulp | 85,0 - 600,0 (331,0) | 8,4 - 22,7 (13,9) |
| Sojameel | 110,0 - 240,0 (147,0) | 13,6 - 18,3 (16,0) |
| Aanbevolen waarde voor paarden | 40-70 | 10 |

Gepelleerd voeder kan een hoge concentratie aan ijzer bevatten met tevens grote variaties. Dicalciumfosfaat vormt een belangrijke ijzerbron net zoals maïsgranen, bietenpulp en sojameel (Clauss et al., 2012). De ijzer- en kopergehalten worden weergegeven in tabel 2.

De ijzerconcentratie in voeder in zoos is zeer variabel en varieert tussen 98 en 1009 mg/kg op droge stof basis. Deze waarden liggen ver boven de aanbevolen waarden voor paarden (40-70 mg/kg op droge stof basis) (Clauss & Hatt, 2006; Clauss et al., 2007b).

In het wild

Het ijzergehalte van het dieet in het wild is doorgaans laag en wordt extra verlaagd door de aanwezigheid van ijzerbindende stoffen zoals tannines (Helary et al., 2012). Browse bevat doorgaans tannines die ijzer in

Tabel 3. Ijzer en kopergehalten op verse stof basis van het dieet in het wild van de zwarte neushoorn in Laikipia, Kenia. Naar Ghebremeskel et al., 1991.

| | Materiaal | Fe (mg/kg) | Cu (mg/kg) |
|---|----------------------------|------------|------------|
| <i>Acacia brevispica</i> (Mimosaceae) | bladeren | 9,1 | 1,2 |
| <i>Phyllanthus fischeri</i> (Euphorbiaceae) | twijg + kleine blaadjes | 11,7 | 1,0 |
| <i>Acacia Hockii</i> (Mimosaceae) | twijg + bladeren + doornen | 12,4 | 1,1 |
| <i>Carissa edulis</i> (Apocynaceae) | twijg + kleine blaadjes | 9,8 | 0,7 |
| <i>Tinnea aethopica</i> (Labiatae) | twijg + kleine blaadjes | 13,6 | 1,2 |
| <i>Euclea divinorum</i> (Ebenaceae) | twijg + kleine blaadjes | 11,9 | 1,1 |
| <i>Ecboium revolutum</i> (Acanthaceae) | twijg + kleine blaadjes | 12,4 | 1,5 |
| <i>Ferula communis</i> (Umbelliferae) | stam | 13,4 | 1,7 |
| <i>Rhus natalensis</i> (Anacardiaceae) | twijg + kleine blaadjes | 9,0 | 1,0 |
| <i>Lippia javanica</i> (Verbenaceae) | twijg + kleine blaadjes | 9,7 | 0,9 |

het voeder zullen binden en het zo onbeschikbaar maken voor absorptie, maar browsende neushoorns kunnen tannines, beter dan witte neushoorns, onschadelijk maken door middel van zogenaamde tannine bindende eiwitten in het speeksel (Clauss et al., 2005a). Er zou ook rekening gehouden moeten worden met de mogelijkheid dat ijzerhoudende aarde en stof op planten mee geconsumeerd kunnen worden, al zou dit slechts in kleine mate van invloed zijn (Helary et al., 2012). Helary et al. (2012) slaagden erin om door middel van backtracking een idee te krijgen over welke plantensoorten en welk deel van deze plantensoorten de neushoorns in een bepaalde periode gegeten hebben. Diezelfde onderzoekers onderzochten de ijzerwaarden van gewassen geconsumeerd door zwarte neushoorns in het wild en vonden variaties per seizoen en per leefgebied. De in deze studie gemeten ijzerconcentraties van gewassen geselecteerd in gevangenschap hadden een gemiddelde waarde van 91 mg/kg ijzer op droge stof basis. In tabel 3 worden de ijzer- en kopergehalten op verse stofbasis van enkele gewassen geconsumeerd in het wild weergegeven.

In het wild versus in gevangenschap

De ijzerconcentraties van voeder geconsumeerd in gevangenschap en voeder geselecteerd in het wild zijn moeilijk met elkaar te vergelijken gezien hiervoor geweten moet zijn hoeveel er van elk gewas gegeten wordt (Helary et al., 2012). Bijvoorbeeld een door Clauss et al. (2007) onderzocht dieet in gevangenschap bevatte

gemiddeld 374 ± 224 mg/kg ijzer op droge stof basis (variërend van 98 tot 1009 mg/kg). Enkele gewassen uit het wilde dieet varieerden van 12 tot 215 mg/kg ijzer op droge stof basis met een gemiddelde van 82 ± 61 mg/kg ijzer. Deze cijfers laten echter geen vergelijking van de totale hoeveelheid geconsumeerd ijzer toe.

In tabel 4 worden de ijzer- en kopergehalten van enkele planten uit het dieet in het wild en het voeder in gevangenschap alsook de referentiewaarden voor paarden weergegeven.

Doorgaans zien we wel dat de gewassen geconsumeerd in gevangenschap een twee- tot vijfmaal zo hoge ijzerconcentratie hebben dan de gewassen geselecteerd in het wild. Dit verschil in ijzergehalte is veel opvallender dan de seizoensgebonden variatie van het ijzergehalte bij de in het wild geconsumeerde planten (Helary et al., 2012).

Tabel 4. Vergelijking van ijzer- en kopergehalten van voeder in het wild met deze in gevangenschap op droge stofbasis. Naar Clauss & Hatt, 2006.

| | Fe (mg/kg) | Cu (mg/kg) |
|--------------------------------|------------|------------|
| Dieet in het wild | 82 | 5 |
| Browse in gevangenschap | 120 | 11 |
| Gras in gevangenschap | 129 | 6 |
| Luzerne in gevangenschap | 180 | 11 |
| Aanbevolen waarde voor paarden | 40-70 | 10 |

3.3.4. Tannines om de ijzeropname te verlagen

Tannines of looistoffen zijn wateroplosbare plantenbestanddelen die aanwezig zijn in de oppervlakkige bescherm laag van planten die door vele herbivoren gegeten worden (Mole, 1993; Frutos et al., 2004). Tannines bevinden zich voornamelijk in de schors, wortels, hout, bladeren en vruchten van vaatplanten (Kumar, 1991; Goel et al., 2005). Ze behoren tot de groep van de secundaire metabolieten van de plant. Dit wil zeggen dat ze geen effect hebben op het primaire metabolisme van de plant, maar in het geval van tannines een rol spelen in de bescherming van de plant tegen pathogenen, insecten, vogels en herbivoren (Bennett & Wallsgrove, 1994).

Tannines kunnen afhankelijk van het type, de dosis en de consumerende diersoort positieve of negatieve effecten hebben na opname. Positieve effecten zijn een antioxidatieve, antibacteriële en anthelmintische werking (Clauss, 2003). Voorbeelden van negatieve effecten zijn verhoogde diurese (Dearing et al., 2001), spijsverteringsstoornissen en het binden van eiwitten en mineralen in het voeder zodat beiden niet geresorbeerd kunnen worden in de darm (Lavin, 2012). Tannines zijn in staat te interfereren met het ijzermetabolisme door complexvorming met ijzer resulterend in een verminderde opname (Hartzfeld et al., 2002). De gevolgen zijn uiteenlopend. Zo kan de binding van mineralen enerzijds een ijzertekort en een verlaagde activiteit van metalloenzymen teweegbrengen. Anderzijds komt de heemproductie in het gedrang (Smith et al., 2005). De hoeveelheid ijzer dat gebonden wordt is dosisafhankelijk (Tuntawiroon, 1991). Ward & Slifka (2011) ondervonden bij de zwarte neushoorn dat sommige hydrolyseerbare tannines verantwoordelijk zijn voor de binding van ijzer. Volgens Helary et al. (2012) zijn ook gecondenseerde tannines hiertoe in staat. Naast ijzer binden tannines ook koperionen. De binding van tannines met

koperionen varieert naargelang het type tannine. De hoeveelheid gebonden koper neemt toe met stijgende pH, maar de temperatuur zou hier geen invloed op hebben (Liao et al., 2004).

Tannines zijn in veel mindere mate aanwezig in onderzochte diëten in gevangenschap in vergelijking met het dieet in het wild. Daarenboven bestaat ook een grote variatie in polyfenolengehalten in voeders (Ward & Hunt, 1989). Daarom is het supplementeren van tannines aan het voeder in gevangenschap een optie om de hoeveelheid ijzer beschikbaar voor absorptie te verlagen (Clauss, 2003; Lavin, 2012). In dezelfde studie van Ward & Hunt (1989) hadden de dieren die de hoogste proportie browse opnamen de laagste concentraties. Hetzelfde browse bevatte echter niet de hoogste hoeveelheid tannines.

Clauss et al. (2007a) testten de invloed van tannine-supplementatie op de smakelijkheid en verteerbaarheid van het voeder. Hiervoor werden quebracho (gecondenseerd tannine) of tanninezuur (hydrolyseerbaar tannine) gebruikt aan een dosis van 5 procent. Er werden geen negatieve effecten gezien. Dit kan zijn doordat browsende neushoorns zich met hun (door tannines induceerbare) tannine bindende speekselwitten hebben aangepast aan tannines in het voeder. Het is ook mogelijk dat de gebruikte concentratie te laag was om een meetbaar effect te kunnen uitlokken.

4. IJZERSTAPELINGSZIEKTE

Ijzerstapelingsziekte, iron storage disease of iron overload syndrome is een aandoening die wat de neushoorns betreft tot nu toe uitsluitend gezien werd bij browsende zwarte en Sumatraanse neushoorns in gevangenschap, maar niet in het wild. Hoewel de stapeling van ijzer bij deze dieren vroeger als een gevolg van verschillende episodes van hemolyse werd gezien wordt de aandoening nu als een aparte ziekte beschouwd met waarschijnlijk een andere oorzaak (Paglia & Tsu, 2012). Ijzerstapelingsziekte werd niet gezien bij de grazende witte neushoorns wat doet vermoeden dat de aandoening gerelateerd is aan het dieet of dat browsers gevoeliger zijn om de ziekte te ontwikkelen (Paglia & Dennis, 1999). De ziekte wordt gekenmerkt door hemochromatose waarvan de ernst afhankelijk is van de periode dat de dieren in gevangenschap leven (Smith et al., 1995; Paglia & Dennis, 1999). De symptomen zijn een verminderde eetlust en lethargie, eventueel in combinatie met symptomen van secundaire infecties (Paglia & Dennis, 1999; Mylniczenko et al., 2012). Er is immers een vermoeden dat ijzerstapelingsziekte aan de basis ligt van infecties en een rol speelt in andere bij de zwarte neushoorn veel voorkomende ziekten waaronder het hemolytisch syndroom en het mucocutaan ulceratief syndroom (Paglia & Dennis, 1999).

4.1. VOORKOMEN

Ijzerstapelingsziekte komt frequent voor en meer bij vogels dan zoogdieren (Klasing et al., 2012). Bij vogels worden vooral verscheidene vruchtenetende en insectivore vogelsoorten (Dierenfeld et al., 1994; Klasing et al., 2012) aangetast. Wat zoogdieren betreft ziet men de ziekte onder andere bij vleermuizen (Crawshaw et al., 1995), maki's (PTAG, 2003), tapirs, paarden (Bonar et al., 2006), vleeseters zoals wasbeerachtigen en zeeroofdieren (Clauss & Paglia, 2012) en de zwarte en Sumatraanse neushoorns (Clauss & Paglia, 2012). Onder de herbivoren zijn vooral monogastrische browsers (eindarmfermenteerders) gevoelig voor ijzerstapelingsziekte (Clauss et al., 2002).

Voor al deze diersoorten wordt de ziekte voornamelijk beschreven in gevangenschap. Er zijn weinig of geen gevallen beschreven in het wild (Crawshaw et al., 1995; Kaisling et al., 2012). Ook bij de mens komt hemochromatose voor. Het gaat hier enerzijds om een erfelijke vorm (primaire hemochromatose) waarbij

autosomaal recessieve mutaties in de genen die coderen voor hepcidine of hepcidine-regulatoren aan de basis liggen (Klasing et al., 2012). Anderzijds zijn er bij de mens ook verworven vormen (secundaire hemochromatose) beschreven. De secundaire vorm kan veroorzaakt worden door sideroblastische en dyserythropoïetische anemie maar ook door anemie veroorzaakt door erfelijke thalassemie (Beutler et al., 2003). Hepcidine is een belangrijk cytokine voor de regulatie van de ijzeropname (Nemeth & Ganz, 2009). Bij vogels zou een schaarste aan ijzer in vruchten en insecten geresulteerd hebben in de adaptatie van het spijsverteringsstelsel voor een mechanisme dat ijzer zo efficiënt mogelijk resorbeert. Maar mechanismen om de ijzeropname te beperken of meer ijzer uit te scheiden wanneer er voldoende ijzer opgenomen is zouden ontbreken. In gevangenschap betekent dit dat een kleine overmaat aan ijzer in het voeder snel resulteert in een overmatige opname van ijzer met ijzerstapelingsziekte tot gevolg (Klasing et al., 2012). Het feit dat de ziekte zich vooral manifesteert bij vruchtenetende vogels in gevangenschap wordt mede verklaard doordat deze soorten door hun felle kleuren meer gegeerd zijn om tentoon te stellen in zoos (Klasing et al., 2012). Bij vleermuizen (*Rousettus aegyptiacus*) in gevangenschap wordt ijzerstapelingsziekte veroorzaakt door een oversupplementatie aan ascorbinezuur (vitamine C) in het voeder. Zij vertoonden chronische leverziekte met opstapeling van ijzer in de lever, soms gevolgd door sterfte. Ascorbinezuur (Vitamine C) zorgt bij deze diersoort voor een verhoogde opname van ijzer (Fe^{2+}) en zorgt voor een verhoging aan reactieve zuurstofverbindingen (Crawshaw et al., 1995; Fleming & Polka, 2012; Klasing et al., 2012).

Ijzerstapelingsziekte komt bij de browsende zwarte en Sumatraanse neushoorns voor. Bij de Sumatraanse neushoorn zijn echter minder gevallen bekend en wordt er minder onderzoek naar de ziekte gedaan. Dit kan verklaard worden door het feit dat de huidige populatie van deze soort nog zeer beperkt is. De ziekte doet zich niet voor bij de grazende neushoornsoorten zoals de witte en Indische neushoorns (Candra et al., 2012; Miller et al., 2012). Bij grazers komt de ziekte niet voor omdat zij een natuurlijk defensiemechanisme ontwikkeld zouden hebben tegen ijzerstapeling gezien het grote aanbod aan ijzer in grassen (Clauss & Paglia, 2012).

4.2. HEMOSIDEROSE EN HEMOCHROMATOSE

De fysiologie van de ijzerstofwisseling is nog niet helemaal opgehelderd bij de neushoorn. Er wordt vanuit gegaan dat het gelijkaardig is aan de fysiologie bij andere zoogdieren inclusief de mens (Ganz & Nemeth, 2012).

In de milt worden verouderde rode bloedcellen afgebroken waarna het vrijgekomen ijzer in de vorm van ferritine in macrofagen wordt opgeslagen. Wanneer veel rode bloedcellen op korte tijd afgebroken worden zoals bij hemolyse (door hemolytische anemie of door een bloedtransfusie (Al-Tubaikh, 2010)) zal ferritine aggregeren en het onoplosbare hemosiderine vormen. Dit is een met de leeftijd vorderend en volkomen fysiologisch proces (Kock et al., 1992). Hemosiderine wordt in eerste instantie opgeslagen in macrofagen in de milt en beenmerg en in de Kupffercellen van de lever, allen behoren tot het mononucleair fagocyterend systeem (Al-Tubaikh, 2010). Het mononucleair fagocyterend systeem wordt gedefinieerd als een familie van cellen bestaande uit beenmergprogenitorcellen, bloedmonocyten en weefselmacrofagen (Hume, 2006). Wanneer de macrofagen van de milt, lever en beenmerg verzadigd zijn ontstaat er hemosiderine stapeling in andere celtypes zoals de hepatocyten en de hartspiercellen (Al-Tubaikh, 2010).

We spreken over hemosiderose wanneer er een hoge opstapeling is van hemosiderine in de milt of hemosiderine teruggevonden wordt in andere organen. Hemosiderose kan ontstaan door hemolyse maar ook wanneer een overmaat aan ijzer in het bloed aanwezig is door een te hoge opname of een gebrek aan

recyclage of uitscheiding van ijzer. Hergebruik van ijzer kan verlaagd zijn bij cachexie, koperdeficiëntie, aplastische anemie en uremie (Kock et al., 1992). Hemosiderine kan in weefsels aangetoond worden met een klassieke hematoxyline-eosine kleuring (kortweg HE-kleuring) of specifiek met Prussiaans blauw (Kock et al., 1992). Dit wordt weergegeven in figuur 8.

De term hemochromatose wordt gebruikt wanneer hemosiderinestapeling leidt tot pathologische veranderingen zoals cirrose in de lever, diabetes en hartschade (Beutler et al., 2003). Op histologisch niveau worden beschadigde en necrotiserende cellen gezien (Paglia & Tsu, 2012). We onderscheiden primaire hemochromatose van secundaire hemochromatose. Bij primaire hemochromatose ligt een aangeboren genetische mutatie aan de basis van de ziekte. Secundaire hemochromatose is meestal geassocieerd met anemie in combinatie met gebrekkige aanmaak van rode bloedcellen gezien dit gepaard kan gaan met een compensatoire hyperabsorptie van ijzer door de darm (Beutler et al., 2003).

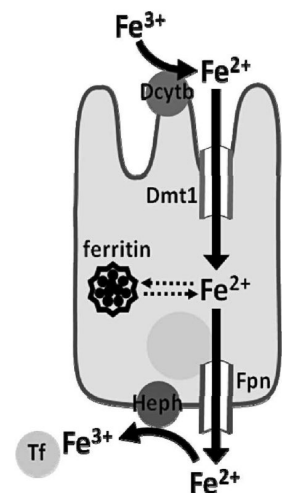
4.3. FYSIOLOGIE VAN DE IJZERSTOFWISSELING

Ijzer is een redox- (kort voor reductie en oxidatie) metaal dat zowel door dieren als planten gebruikt wordt voor het katalyseren van oxidatie-reductie reacties, elektronentransport in mitochondriën en zuurstoftransport in het aërobe metabolisme (Cherukuri et al., 2005; Weiss, 2005; Klasing et al., 2012). Bij gewervelde dieren is ijzer een belangrijk element van heem in hemoglobine en myoglobine. Voor de heemproductie wordt meer dan 70 procent van de totale ijzerbehoefte van het lichaam verbruikt (McDowell, 2003; Klasing et al., 2012).

Opname

Ijzer afkomstig uit het voeder wordt opgenomen door de proximale dunne darm (Ganz & Nemeth, 2012). Het opnameproces wordt weergegeven in figuur 5.

Vrij ijzer in de darm is doorgaans driewaardig, ook wel de ferri-vorm (Fe^{3+}) genoemd. Duodenaal cytochroom B zorgt voor de reductie van het ferri-ijzer tot tweewaardig ijzer (Fe^{2+} , de ferro-vorm) dat vervolgens opgenomen kan worden door duodenale enterocyten (Ganz & Nemeth, 2012). De opname van ijzer gebeurt in de darm door een samenwerking van verschillende transporters. Divalent metal transporter 1 aan de apicale zijde van de enterocyt zorgt voor de opname en transport van ferro-ijzer naar het cytoplasma van de enterocyt (Klasing et al., 2012). Het opgenomen ferro-ijzer wordt afhankelijk van de noden intracellulair opgeslagen als ferritine of naar de basale zijde van de enterocyt getransporteerd (Ganz & Nemeth, 2012). Aan de basale zijde zorgt ferroportine voor het transmembranair transport van ferro-ijzer richting de bloedbaan (Klasing et al., 2012). Net na dit transport wordt het tweewaardig ijzer opnieuw geoxideerd tot driewaardig ijzer door de koperhoudende ferroxidasen hephestine en ceruloplasmine. Dit mechanisme kan een belangrijke link zijn tussen het koper- en ijzermetabolisme (Vulpe et al., 1999, Cherukuri et al., 2005). Membraangebonden ceruloplasmine is cruciaal voor de stabiliteit van het ferroportine (De Domenico et al., 2007) en voor de vrijstelling van ijzer uit opslagplaatsen (Aigner et al., 2008). Bij een tekort aan hephestine bij muizen wordt microcytaire hypochrome anemie vastgesteld (Vulpe et al., 1999). Het driewaardig ijzer kan vervolgens binden aan transferrine in het bloed (Ganz & Nemeth, 2012).



Figuur 5. Ijzeropname door de enterocyt. Uit Ganz & Nemeth, 2012.

Transport

In het bloed wordt het overgrote deel van het ferri- (Fe^{3+}) ijzer gebonden aan transferrine. Transferrine is een in de lever geproduceerd eiwit dat het ijzer afkomstig van de darm, ijzerstapelende organen en macrofagen naar verschillende ijzerverbruikende organen zoals de lever en beenmerg transporteert (Hallquist & Klasing, 1994; Collins, 2003; Cherukuri et al., 2005). Nadat het transferrine-Fe complex de transferrinereceptor op de celmembranen gebonden heeft wordt het complex door een clathrine gemedieerd proces opgenomen in het cytoplasma (Hentze et al., 2004). Na splitsing van het complex in Fe en transferrine wordt transferrine gerecycleerd en weer vrijgegeven in het bloed. In het beenmerg bijvoorbeeld wordt het ijzer vervolgens gebruikt voor de aanmaak van rode bloedcellen (Ganz & Nemeth, 2012).

Transferrine is naast een transporteiwit ook een negatief acute fase eiwit. Dit wil zeggen dat de hoeveelheid transferrinemoleculen in het bloed tijdens de acute fase van de ontsteking zal dalen door een verlaagde productie in de lever (Gruys et al., 2005). Bijgevolg neemt ook de ijzerresorptie af (Klasing et al., 2012). Daarnaast bezitten zoogdieren, in tegenstelling tot vogels het lactoferrine (Klasing et al., 2012). Lactoferrine is een positief acute fase eiwit dat het transport van extracellulair ijzer naar het mononucleair fagocyterend systeem stimuleert. Samen zorgen transferrine en lactoferrine tijdens de ontsteking dus voor een lagere ijzerspiegel in het bloed (Van Snick et al., 1874; Hallquist & Klasing, 1994; Klasing et al., 2012). Hierdoor is er minder ijzer beschikbaar voor bacteriën (Collins, 2003).

Opslag

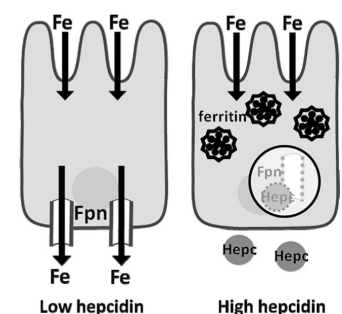
Ijzer wordt voornamelijk opgeslagen in de lever, milt, beenmerg en cellen van het mononucleair fagocyterend systeem onder de vorm van ferritine. De lever bevat 60 procent van de totale hoeveelheid ferritine. Apoferritine ofwel ferritine zonder gebonden ijzer wordt aangemaakt bij een positieve ijzerbalans en bindt ijzerhydroxide en ijzerfosfaat (McDowell, 2003). Ferritine is een globuline en een positief acute fase eiwit (Prieto et al., 1975; Smith et al., 1995). Een tweede molecule waaronder ijzer gestapeld wordt is hemosiderine. Bij veel diersoorten is hemosiderine de dominerende ijzerstapelingsvorm bij een hoge ijzerstatus terwijl ferritine als opslagvorm domineert bij een lage ijzerstatus (McDowell, 2003).

Uitscheiding

De uitscheiding van ijzer is zeer summier en weinig gereguleerd. Het gebeurt bij zoogdieren en vogels in kleine hoeveelheden via haren, zweet, afschilferende cellen van het spijsverteringsstelsel en via de urine (Ganz & Nemeth, 2012; Klasing et al., 2012).

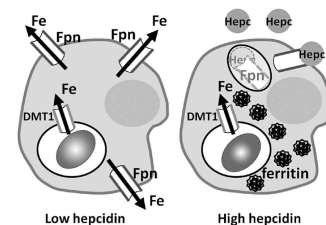
Regulatie

De lever is het belangrijkste regulerende orgaan van het ijzermetabolisme via de zogenaamde hepcidine-ferroportine as (Ganz & Nemeth, 2012). Wanneer er een overmaat aan ijzer gebonden is aan transferrine in het bloed of in de hepatocyten van de lever aanwezig is ontstaat er een verhoogde secretie van het cytokine hepcidine door de hepatocyten (Rossi, 2005; Nemeth & Ganz, 2009; Wessling-Resnick, 2010, Ganz & Nemeth, 2012). Hepcidine bindt ferroportine op enterocyten, hepatocyten en macrofagen waarop endocytose en vervolgens afbraak van dit eiwit geïnduceerd worden. Hierdoor wordt het ijzertransport van de enterocyten, macrofagen en hepatocyten (Ganz, 2011) naar het bloed verhinderd en stapelt ijzer zich in deze cellen op (Ganz & Nemeth, 2012). Ijzer dat meer dan 3 à 5 dagen opgeslagen blijft in de enterocyt als ferritine zal met het vervallen van de cellen afgevoerd worden met de mest. Dit werd vroeger het "mucosal block" genoemd (Crosby, 1963).



Figuur 6. De invloed van hepcidine op de enterocyten. Uit Ganz & Nemeth, 2012.

De hepcidineproductie stijgt bij een overmaat aan ijzer in de lever en daalt bij een ijzertekort (Ganz & Nemeth, 2012). De hepcidine-ferroportine as stemt zo de resorptie van ijzer af op de behoefte (Nemeth & Ganz, 2009). Redenen voor een daling van de hepcidineconcentratie zijn hypoxie (Wessling-Resnick, 2010), hemolyse en een verhoogde erythropoïetische activiteit na een bloeding. Ook de toediening van erythropoïetine zou de hepcidineconcentratie doen afnemen gezien het de productie van heem stimuleert. Dit mechanisme is aanwezig bij verschillende zoogdieren en waarschijnlijk ook bij de neushoorn (Ganz & Nemeth, 2012). Hepcidine zou ook het placentaal ijzertransport inhiberen bij muizen (Nicolas et al., 2002).



Figuur 7. De invloed van hepcidine op macrofagen. Uit Ganz & Nemeth, 2012.

Wanneer rode bloedcellen degenereren worden ze opgenomen door macrofagen. De macrofagen functioneren gelijkaardig aan de enterocyten wat hun ijzermetabolisme betreft. Macrofagen zullen het ijzer afkomstig van de rode bloedcellen opslaan als ferritine of het via ferroportine afgeven aan transferrine in de bloedbaan. Dit mechanisme wordt op dezelfde manier gereguleerd door hepcidine als bij de enterocyten. Zo zal het ijzer in de macrofagen gehouden worden bij een hoge hepcidineconcentratie in het bloed (Ganz & Nemeth, 2012).

Regulatie bij ontsteking

Tijdens de acute fase respons van een ontsteking worden pro-inflammatoire cytokines zoals interferon gamma vrijgesteld door macrofagen en lymfocyten. Dit brengt een mechanisme op gang waardoor er veranderingen optreden in het ijzermetabolisme om bescherming te bieden tegen pathogenen. Ijzer is immers de eerste limiterende factor voor de groei van veel microben in de intra- en extracellulaire compartimenten van het lichaam (Klasing et al., 2012). Twee mechanismen zijn hiervoor verantwoordelijk. Macrofagen bezitten net als andere ijzer opnemende cellen transferrine receptoren (TfR) op hun celmembraan (Collins, 2003). Interferon gamma, een cytokine dat tijdens een bacteriële ontsteking vrijgesteld wordt door lymfocyten onderdrukt de expressie van de transferrinereceptoren. Op die manier verhindert het immuunsysteem de beschikbaarheid van ijzer voor intracellulaire pathogenen (Collins, 2003; Nairz et al., 2008).

Het tweede mechanisme heeft als functie om extracellulaire bacteriën en tumorcellen te bestrijden. Bij een ontstekingsreactie wordt bij mensen en knaagdieren de ijzerresorptie in de darm verlaagd door een verhoogde productie van hepcidine (Wessling-Resnick, 2010). De verhoogde productie van hepcidine wordt gestimuleerd door vrijstelling van het cytokine interleukine 6 (Nemeth et al., 2004). Daarenboven zou hepcidine ook door macrofagen en neutrofielen geproduceerd kunnen worden (Wessling-Resnick, 2010). Verder zorgt hepcidine dat ijzer uit de circulatie opgeslagen wordt in het mononucleair fagocyterend systeem. Door de daling van de ijzerspiegel in het bloed en stijging van ferritine in de lever, milt en beenmerg spreken we van hypoferremie en hyperferritinemie respectievelijk. Hierdoor is er minder ijzer beschikbaar voor extracellulaire bacteriën en tumorcellen. Zowel bacteriën als tumorcellen hebben ijzer nodig om te vermeerderen (Weiss, 2005). Het wordt afgeraden om tijdens een ontsteking ijzer te supplementeren gezien deze beschermende effecten dan teniet gedaan worden (Klasing et al, 2012). Gedurende de inhibitie van de vrijstelling van ijzer blijven de macrofagen rode bloedcellen opnemen. Bij een chronisch ontstekingsproces kunnen macrofagen op die manier overladen worden met ijzer terwijl de aanvoer van ijzer naar het beenmerg gelimiteerd wordt. Dit heeft een verminderde aanmaak van rode bloedcellen tot gevolg. De ijzerresorptie uit de darm wordt ook gehinhibeerd met een lage ijzerspiegel en zelfs een ijzertekort tot gevolg (Ganz & Nemeth, 2012).

Er worden tijdens de acute fase respons ook metallothioneïnes vrijgesteld. Volgens Baird et al. (2006) binden metallothioneïnes vrij en reactief ijzer in het cytoplasma en beschermen op die manier de lysosomen tegen oxidatieve stress. Metallothioneïnes zorgen dus voor een verhoogde weerstand van levercellen tegen de toxische effecten van metalen en laten vermoedelijk op die manier een hogere ijzerstapeling in de lever toe (Gruys et al., 2005).

4.4. OORZAKEN

Zoals hoger vermeld komt ijzerstapelingsziekte bij zowel de zwarte als Sumatraanse neushoorn voor wanneer de dieren uit hun natuurlijke habitat genomen worden (Candra et al., 2012). Gezien uitsluitend browsende neushoornsoorten aangetast zijn en het in gevangenschap zeer moeilijk is een vergelijkbaar dieet als in het wild te voorzien heerst een sterk vermoeden dat het voeder een belangrijke invloed op de ziekte heeft (Candra et al., 2012). Er werd echter nog geen sluitende oorzaak gevonden. Browsende neushoorns hebben een mechanisme ontwikkeld om zoveel mogelijk ijzer te recupereren uit een van nature ijzerarm browse maar hebben een gebrekkig mechanisme om ijzer uit te scheiden (Clauss & Paglia, 2012). Volgens Dierenfeld et al. (2005) is het onwaarschijnlijk dat oversupplementatie van ijzer via het voeder de enige oorzaak is. Het zou om een combinatie gaan met een overactief absorptiemechanisme en/of een gebrekkig uitscheidingsmechanisme. Daarnaast zijn problemen in de ijzerhomeostase niet uit te sluiten (Ganz et al., 2012).

De eerste vraag die Ganz et al. (2012) zich stelden is of ijzerstapelingsziekte bij browsende neushoorns veroorzaakt wordt door gecompenseerde hemolyse of door een primair defect in de regulatie van ijzerabsorptie en -excretie. Ook infecties (Clauss & Paglia, 2012), genetische defecten (Beutler et al., 2001), problemen in de koperhuishouding (Aigner et al., 2008), insulineresistentie (Nielsen et al., 2012) en stress zouden mogelijke oorzaken kunnen zijn (Ganz et al., 2012).

Te hoog aanbod aan ijzer

- 1) Ijzer wordt uitsluitend via de darm opgenomen. Een overmaat aan ijzer en een te hoge biologische beschikbaarheid van ijzer in het voeder kunnen belangrijke oorzaken zijn van overmatige resorptie (Paglia & Dennis, 1999; Clauss & Paglia, 2012). Zoals hoger vermeld bevat het voeder in gevangenschap doorgaans aanzienlijk meer ijzer dan een dieet in het wild (Helary et al., 2012). De biologische beschikbaarheid van ijzer wordt verhoogd door een tekort aan natuurlijke ijzerbinders in het voeder (Paglia & Dennis, 1999; Clauss & Paglia, 2012). Zulke ijzerbinders zijn fytaten, tannines en andere polyfenolen (Paglia & Dennis, 1999). Tannines en andere polyfenolen komen voornamelijk voor in browse en in veel mindere mate in grassen (Kumar, 1991; Goel et al., 2005a). Een dieet dat in zoos verschaft wordt bestaat doorgaans uit een beperkte variatie aan browse en hooi en bevat meestal meer ijzer dan een dieet geselecteerd in het wild (Candra et al., 2012). Volgens Candra et al. (2012) zou het aandeel aan ijzerbinders in het voeder zelfs belangrijker zijn dan het ijzergehalte. Het ijzergehalte van commerciële voeders is frequent te hoog door de aanwezigheid van ijzerbronnen zoals calcium en fosfaatbronnen en door het gebruik van ijzeren machines voor de voederverwerking (Clauss & Paglia, 2012).¹⁾
- 2) Veranderingen in samenstelling van de bacteriële flora kunnen zorgen voor een wijziging in het verbruik van ijzer uit het dieet. (Ganz et al., 2012)
- 3) Een gebrek aan vezels, zowel oplosbare als onoplosbare kan de biologische beschikbaarheid van ijzer in het voeder verhogen (Helary et al., 2012)

Verlaagde excretie

Een hypothese luidt dat de excretie van ijzer gebeurt door middel van chelatoren in de browse en sideroforen geproduceerd door bacteriën, schimmels en gisten. Zowel chelatoren als sideroforen kunnen ijzer binden en vervolgens worden de complexen uitgescheiden via de mest of urine. Deze sideroforen en chelatoren zouden dan afwezig kunnen zijn bij browsende neushoorns in gevangenschap, maar werd nog niet onderzocht (Ganz et al., 2012).

Problemen in de homeostase

Primaire defecten in de regulatie van ijzerabsorptie en excretie kunnen ook veroorzaakt worden door problemen in de hemostase ten gevolge van (Ganz et al., 2012; Klasing et al., 2012):

- een afwijkende expressie van de genen voor ijzer regulerende stoffen;
- een gebrek aan hepcidine met een verminderde inhibitie van de intestinale opname van ijzer;
- een overmatige absorptie kan veroorzaakt worden door een overmatige expressie van de divalente metaal transporter 1 en ferroportine. Een destabilisatie van hepcidine-ferroportine as wordt als mogelijke oorzaak vooropgesteld bij mensen en knaagdieren maar werd nog niet aangetoond bij de neushoorn;
- een mineralendisbalans in zink, koper of molybdeen;
- stress als trigger voor acute fase eiwitten (hepcidine, hemopexine, haptoglobine, lactoferrine en transferrine) met verandering in de ijzeropname en/of distributie;
- een vitamine D intoxicatie als oorzaak van hypercalcemie. Hypercalcemie werd gezien in combinatie met ijzerstapelingsziekte.

Hemolyse

Een waarschijnlijk minder voor de hand liggende oorzaak van ijzerstapelingsziekte is een overmatige of inefficiënte aanmaak van rode bloedcellen. Hierdoor wordt hepcidine onderdrukt met hyperabsorptie van ijzer tot gevolg (Ganz & Nemeth 2012). Een mogelijkheid is een niet gecompenseerde hemolyse waardoor er veel ijzer vrijkomt (Ganz et al. 2012). Bij chronische hemolytische anemie zou een verhoogde resorptie van ijzer door de verhoogde erythropoïetische activiteit voor ijzerstapeling kunnen zorgen. Hierbij worden ook verhoogde haptoglobinespiegels verwacht (Smith et al., 1995). Maar de overmatige aanmaak van rode bloedcellen zou dan wel gestimuleerd moeten zijn in gevangenschap en uitsluitend bij browsende neushoorns. Volgens deze hypothese zou een schaarste aan een voor de essentieel element voor de aanmaak van rode bloedcellen in het voeder in gevangenschap de oorzaak moeten zijn (Ganz & Nemeth 2012).

Voorgestelde oorzaken van hemolyse zijn (Ganz et al., 2012):

- hemolysines afkomstig van luzerne en hemolysine producerende bacteriën zoals *Clostridium* spp.;
- een hogere fragiliteit van rode bloedcellen ten gevolge van oxidatieve stress veroorzaakt door ijzer (Ganz et al., 2012). In rode bloedcellen van de zwarte neushoorn werden hoge gehalten aan vrij tyrosine en urinezuur gevonden. Beiden binden vrije radicalen zoals intermediaire zuurstofradicalen vrijgesteld bij oxidatieve stress. Het intracellulair in grote mate aanwezige dityrosine geeft blijk van een hoge graad van oxidatieve stress in de rode bloedcellen.. De verhoogde aanmaak van tyrosine en purinederivaten zouden als extra bescherming dienen tegen oxidatieve reacties (Harley et al., 2004);
- een verhoogde fagocytotische activiteit van macrofagen ten opzichte van rode bloedcellen;
- hogere oxidatieve stress bij browsende neushoorns in gevangenschap in vergelijking met in het wild levende neushoorns;
- een minder efficiënte aanmaak van rode bloedcellen bij zwarte neushoorns in vergelijking met witte neushoorns.

Ontsteking en infecties

Infecties, ontstekingen en langdurig vasten behoren ook tot de mogelijke oorzaken. Hierbij is het belangrijk een onderscheid te maken tussen ijzerstapelingsziekte veroorzaakt door een onevenwicht in het ijzermetabolisme met secundaire infecties tot gevolg enerzijds en ziekte veroorzaakt door andere aandoeningen met secundaire ijzerstapelingsziekte anderzijds (Clauss & Paglia, 2012).

Genetisch

Beutler et al. (2001) zochten naar een genetische oorzaak gezien browsende neushoorns zich aangepast hebben aan een ijzerarm dieet. Ze onderzochten het HFE gen bij neushoorns gezien ijzerstapelingsziekte bij mensen veroorzaakt wordt door een mutatie in dit gen. Het HFE gen codeert voor een eiwit dat een rol speelt in de regulatie van het ijzermetabolisme. Ze vonden een mutatie in de regio die een wijziging van een aminozuur veroorzaakt en invloed heeft op de interactie tussen de transferrinereceptor en HFE. Deze mutatie werd alleen bij de zwarte neushoorns, en niet bij de Sumatraanse, witte of Indische neushoorns gevonden. Bijgevolg is het weinig waarschijnlijk dat het HFE gen aan de basis van ijzerstapelingsziekte bij beide browsende neushoorns ligt (Beutler et al., 2001). Een fout in de HFE expressie kan leiden tot verhoogde ijzerabsorptie via enterocyten en bijgevolg ijzerstapeling in het parenchym van verschillende organen (Olias et al., 2012).

Invloed van koper

Er zijn verschillende theorieën over de manier waarop een kopertekort tot ijzerstapeling zou kunnen leiden. Een dieet arm aan koper zou gastrointestinale mineralentransporters stimuleren met een verhoogde ijzerresorptie tot gevolg (Mylniczenko et al., 2012). Volgens Welsch et al. (2006) wordt hemosiderine meer gevormd bij koperdeficiënte dieren. Ganz et al. (2012) gaan uit van de hypothese dat ceruloplasmine inactief wordt door een gebrek aan koper, haar cofactor waardoor ijzer gevangen blijft in macrofagen, enterocyten (Groff, 2000) en opslagplaatsen waaronder de hepatocyten (Aigner et al., 2008). De ceruloplasmine concentratie zou niet beïnvloed worden door het kopergehalte.

Dierenfeld et al. (2005) onderzochten koperwaarden in het bloed en de lever van witte en zwarte neushoorns in gevangenschap. In het bloed werd een hogere koperwaarde gevonden bij beide neushoornsoorten in gevangenschap in vergelijking met in het wild levende dieren en paarden. Daarentegen werd een lagere koperwaarde vastgesteld in leverweefsel van zwarte neushoorns in vergelijking met de witte neushoorn. Deze leverwaarden vallen echter wel binnen de grenzen voor het paard. Hieruit werd de mogelijkheid afgeleid dat de kopergehalte van de lever geen correcte weergave van het kopergehalte in het bloed zou kunnen zijn bij neushoorns. Er werd tot nu toe nog geen klinisch geval ten gevolge van kopertekort gerapporteerd (Clauss & Hatt, 2006).

In een humane studie werd bij mensen die lijden aan nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) een link gevonden tussen lage kopergehalten in serum en lever en ijzerstapeling in de lever. De door de leveraandoening veroorzaakte koperdeficiëntie wordt geassocieerd met een lage serum ceruloplasmine concentratie en verlaging van het lever ferroportinegehalte. Het verlaagde ferroportinegehalte zou te wijten zijn aan een verhinderde messenger RNA expressie voor dit eiwit. De gevolgen hiervan zijn een verlaagde mogelijkheid van de lever om ijzer uit te scheiden en een verhoging van het serum ferritinegehalte. Een verlaagde koperopname bij varkens en ratten alsook de knock-out van het ceruloplasmine gen bij muizen zou dezelfde effecten teweeg brengen (Aigner et al., 2008).

Insulineresistentie en obesitas

Nielsen et al. (2012) onderzochten de link tussen insulineresistentie en ijzerstapeling bij paarden als model voor de zwarte neushoorn. Bij de mens werd dit verband reeds aangetoond (Xiao et al., 2011).

Verschillende onderzoekers vermoeden dat een verhoogde opname van ijzer een belangrijke risicofactor is voor het ontwikkelen van insulineresistentie. Daarenboven zouden hoge insulinegehalten bijdragen tot het ontwikkelen van ijzerstapeling door de cellulaire ijzeropname en synthese van ferritine te stimuleren. Er werd een positief verband gezien tussen de insulinerespons na toediening van glucoserijk voedsel en de serum ferritine concentratie. Weinig beweging en obesitas zouden ook bij de neushoorn risicofactoren zijn voor het ontwikkelen van insulineresistentie (Nielsen et al., 2012). Insulineresistentie is volgens Clauss & Paglia (2012) weinig waarschijnlijk gezien de witte neushoorn veel vatbaarder is voor het ontwikkelen van obesitas in gevangenschap dan de zwarte neushoorn.

Obesitas gaat bij kinderen gepaard met een verhoogd hepcidinegehalte in vergelijking met niet-obese kinderen. Obesitas zorgt immers voor een chronische milde ontstekingsreactie, wat de vrijstelling van hepcidine kan stimuleren (Aeberli et al., 2009). Dit verband werd nog niet aangetoond bij neushoorns.

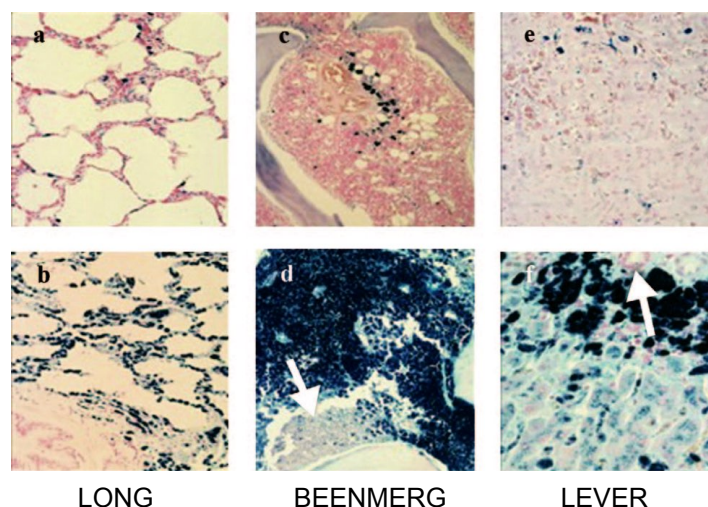
Stress

Iedere factor die een acute fase respons uitlokt kan ijzerstapeling teweegbrengen door een stijging van acute fase eiwitten zoals ferritine en hepcidine. Ook stress zou een oorzakelijke factor kunnen zijn, bijvoorbeeld door de suboptimale huisvesting in gevangenschap. Er wordt vermoed dat ijzerstapelingsziekte bij vogels veroorzaakt wordt doordat transferrine zou reageren als een positief in plaats van negatief acute fase eiwit (Ganz et al., 2012).

4.5. PATHOFYSIOLOGIE

Een goede ijzerhomeostase is belangrijk. Een tekort aan ijzer kan leiden tot anemie en een tekort aan verschillende enzymen. Een overmaat leidt dan weer tot hemosiderose en hemochromatose, zie hoger (Beutler et al., 2001).

De schadelijke effecten van ijzer komen tot stand wanneer tweewaardige ijzerionen (Fe^{2+}) cyclisch oxidatie en reductie ondergaan. Hierbij kunnen er vrije hydroxylradicalen gevormd worden die vetten, nucleïnezuuren en eiwitten kunnen oxideren wat leidt tot het breken van DNA strengen, depolymerisatie van eiwitten en inactivatie van enzymen (McCord, 1994; Klasing et al, 2012). Bij de reacties van de radicalen met suikers, vetten en eiwitten kunnen nieuwe vrije radicalen gevormd worden met kettingreacties en nog meer schade



Figuur 8. Prussiaans-blauwkleuringen van de long, beenmerg en lever. a, c en e: Afrikaanse witte neushoorn. b, d en f: zwarte neushoorn. Naar Paglia & Tsu (2012).

tot gevolg (Paglia & Tsu, 2012). De rode bloedcellen van neushoorns zouden hier zeer gevoelig aan zijn (Paglia & Dennis, 1999). Deze oxidatiereacties worden tegengegaan door antioxidanten zoals vitamine E. Wanneer de antioxidanten niet meer in staat zijn de oxidatiereacties onder controle te houden spreekt men van oxidatieve stress.

De vorming van hydroxylradicalen kan tot op zekere hoogte voorkomen worden door complexvorming van ijzerionen tot ferritine of het binden van ijzerionen aan complexvormende eiwitten zoals transferrine in het bloed. Deze processen houden het ijzer stabiel (McCord, 1994; Klasing et al., 2012). Ijzer wordt daarom zo veel mogelijk onder deze veilige vormen in cellen en lichaamsvochten gehouden (Klasing et al., 2012). Ferritine is echter gevoelig voor superoxide radicalen die kunnen zorgen voor het vrijkomen van ijzerionen uit het ferritine (Dennis et al., 2007).

De orgaanschade kan, zoals aangetoond bij knaagdieren, op verschillende manieren veroorzaakt worden. Een eerste mogelijkheid is door accumulatie van ijzer in lysosomen van aangetaste cellen waardoor deze lysosomen breken. Hierdoor kunnen geïoniseerd ijzer en lysosomale enzymen vrijkomen in het cytoplasma met oxidatieve schade van eiwitten en de celmembraan tot gevolg. Bijgevolg treedt in volgorde van matige tot erge schade autofagocytose, apoptose of necrose van de cellen op (Eaton & Qian, 2002).

Een tweede mogelijkheid is de beschadiging van mitochondriën met lekkage van elektronen (Britton et al., 1994; Eaton & Qian, 2002). Mitochondriën vereisen immers veel ijzer voor de productie van heem (Hentze et al., 2004). De elektronen zullen oxidatieve stress in de cel veroorzaken met beschadiging van membranen en mitochondriaal DNA en tenslotte celdood tot gevolg. De celdood gaat samen met cytokine-gemedieerde fibrose van het weefsel (Britton et al., 1994; Eaton & Qian, 2002).

De hoger beschreven zuurstofradicalen kunnen cellen beschadigen door het initiëren van auto-oxidatie reacties, door het toevoegen van dubbele bindingen, door waterstof te ontbinden van koolstofatomen en door oxidatie van sulfhydryl, thioether en aminozuren. De gevolgen van deze reacties zijn een verhoogde radiogevoeligheid, mutaties, chromosomale defecten, tumorvorming, degeneratieve veroudering en uiteindelijk de dood van het dier (Weinberg, 1990).

Volgens sommige onderzoekers tast ijzerstapelingsziekte het immuunsysteem aan waardoor aangetaste dieren gevoeliger worden voor infecties met tuberculose, Aspergillus en andere fungus geassocieerde longontstekingen, Leptospirose en Salmonella (Osofsky et al., 2001; Paglia & Tsu, 2012). Ijzer is in staat de activiteit van witte bloedcellen te ondermijnen waardoor de groei van microben en tumorcellen de vrije loop kan hebben. De capaciteit om te fagocyteren van zowel neutrofielen als monocytten, alsook de microbicide activiteit van monocytten wordt negatief beïnvloed door ijzer. Macrofagen worden dan weer verhinderd in hun strijd tegen tumoren. Microben en tumorcellen voeden zich met ijzer (Kontoghiorghes & Weinberg, 1995). Anderzijds is ijzer de eerste limiterende factor voor hun groei (Klasing et al., 2012).

De aantasting van de organen start vermoedelijk met de aantasting van de cellen van het mononucleair fagocyterend systeem. De interstitiële macrofagen ondergaan hyperplasie en ijzerstapelingsziekte. Hierdoor ontstaan met hemosiderine beladen cellen die door hun volume de structuur van de organen verstoren. Hierbij worden onder meer hematopoïetische cellen van het beenmerg en vet verplaatst. De mucosale en transmurale infiltraten van met ijzer beladen macrofagen kunnen gezien worden van het duodenum tot en met het colon. Vervolgens worden ook parenchymale cellen van verschillende organen aangetast (Paglia & Tsu, 2012). De long lijkt pas laat in het ziekteproces aangetast te worden (Olias et al., 2012). In de ergste gevallen werden brugvormende fibrose, regeneratieve nodules, proliferatie van de galgangen en soms zelfs erge cirrose en hepatocarcinoma waargenomen. De celschade en necrose zijn duidelijk herkenbaar. Het verlies van ferritine uit de gestorven cellen veruiterlijkt zich als een stijging van de serum ferritine concentratie. Deze letsels werden zowel bij de zwarte als Sumatraanse neushoorns vastgesteld (Paglia &

Tsu, 2012). De aantasting van organen kan leiden tot functieverlies, een verhoogde gevoeligheid voor infectie en vermoedelijk ook andere ziekten. Maar de aandoening is niet geassocieerd met klinische tekenen van lever- of nierfalen (Olias et al., 2012). Op figuur 8 zijn duidelijke verschillen te zien tussen de ijzerstapeling in de long, beenmerg en lever van een Afrikaanse witte neushoorn en de zwarte neushoorn.

4.6. DIAGNOSE

De door Mylniczenko et al. (2012) vastgestelde klinische symptomen bij dieren met ijzerstapelingsziekte zijn lethargie, verminderde eetlust en minder zin in training. Een van de vrouwelijke aangetaste dieren in dezelfde studie werd acyclisch. Hoewel ze haar cyclus hernam na het verlagen van het ijzergehalte in het dieet, heeft men geen sluitend verband met ijzerstapelingsziekte kunnen aantonen. Naast een slechte algemene toestand werd er ook atrofie van lymfoïd weefsel gezien (Kock et al., 1992)

Om een idee te krijgen over de ijzerstatus van een dier worden doorgaans serum ijzer (de hoeveelheid aan transferrine gebonden ijzer), serum ferritine, de totale ijzersaturatie en de totale ijzerbindingscapaciteit bepaald (Mylniczenko et al., 2012). Hoewel het ferritinegehalte in het bloed bij verschillende diersoorten (honden, katten, varkens, paarden en de mens) een goede weergave blijkt te zijn van het in de weefsels opgeslagen ijzer is dit nog niet bewezen voor neushoorns (Smith et al., 1995). Bij ferritine dient ook rekening gehouden te worden met schommelingen tijdens ontstekingen gezien het een positief acute fase eiwit is (Mylniczenko et al., 2012). Wanneer de ferritine test niet beschikbaar is, biedt de transferrine saturatie (de ratio tussen serum ijzer en de totale ijzer bindingscapaciteit) een minder accuraat maar goed alternatief (Paglia & Tsu, 2012).

De gouden standaard is het nemen van leverbiopten. Dit is echter moeilijk door de ligging van de lever, de dikte van de huid en de moeilijkheidsgraad van de echografische begeleiding (Mylniczenko et al., 2012).

Verschillende studies hebben sterk verhoogde ijzerwaarden bij zwarte en Sumatraanse neushoorns in gevangenschap in vergelijking met hun soortgenoten in het wild evenals de grazende neushoorns aangetoond. Wat de lever betreft is de niet-heem ijzerwaarde soms vijfmaal hoger, evoluerend met de leeftijd of tijd in gevangenschap. Voor ferritine werden vijftien tot vijfentwintig maal hogere concentraties gemeten (Paglia & Tsu, 2012).

In een studie door Miller et al. (2012) werden zowel bij zwarte als witte neushoorns in het wild hogere gemiddelde serum ijzerconcentraties gezien bij volwassen dieren in vergelijking met jongere dieren. Deze resultaten kunnen wijzen op een stijging van de ijzerconcentratie in het bloed met de leeftijd. Ook neemt de ergheid van de ziekte zowel bij de zwarte als Sumatraanse neushoorns toe naarmate de dieren langer in gevangenschap leven (Smith et al., 1995; Candra et al., 2012).

Op pathologisch onderzoek werd ijzer voornamelijk teruggevonden in macrofagen in verschillende weefsels waaronder Kupffercellen in de lever (Citino et al., 2012). Soms is ijzerstapeling een toevalsbevinding op pathologisch onderzoek waarbij het niet per se hoeft bijgedragen te hebben tot de dood van het dier (Clauss & Paglia, 2012). Smith et al. (1995) zagen bij vergelijking van zwarte met witte neushoorns dat alleen de zwarte neushoorns ijzer in de lever opstapelden in gevangenschap. De serum (niet-heem) ijzer concentratie, transferrine saturatie en serum ferritine waarde waren significant hoger bij de zwarte in vergelijking met de witte neushoorn. Het ferritinegehalte van zwarte neushoorns steeg bovendien met de tijd in gevangenschap. Er werd geen verschil in haptoglobinegehalte tussen beide neushoornsoorten opgemerkt wat hemolytische anemie als oorzaak minder waarschijnlijk maakt. Haptoglobine is een eiwit dat hemoglobine afkomstig van rode bloedcellen bindt in het bloed (Langlois & Delanghe, 1996). Ook Paglia et al. (2001a) zagen hoge

weefsel- en serumijzer concentraties, hoge ferritine concentraties en hoge transferrinesaturatie bij gestorven zwarte en Sumatraanse neushoorns, in tegenstelling tot de onderzochte witte en Indische neushoorns.

Bij een andere histopathologische studie werd een massieve stapeling van ferri-ijzer in de lever, milt, beenmerg, longen, dunne en dikke darm, lymfeknopen en endocriene organen gezien (Paglia & Tsu, 2012). In een studie van Olias et al. (2012) werden er niet alleen bij zwarte neushoorns uitgebreide ijzerstapeling in verschillende organen gezien maar ook bij de grazende Indische neushoorn. De witte neushoorns in deze studie vertoonden slechts een milde stapeling in enkele organen (macrofagen van de dunne darm, lever en long). Bij de zwarte neushoorns werd de ergste ijzerstapeling gezien in de dunne darm, lever (Kupffercellen en hepatocyten met fibrose en hepatocellulaire necrose), milt en longen. Daarnaast waren ook de hersenen, lymfeknopen, bijnieren en schildklieren in mindere mate aangetast. Bij sommige dieren waren de pancreas, nieren, beenmerg en myocard aangetast. Bij de Indische neushoorns waren de lever (alleen Kupffercellen), milt en longen aangetast bij alle onderzochte dieren. Bij sommigen werd ijzerstapeling gezien in de lymfeknopen, bijnieren, pancreas, nieren en dunne darm villi.

4.7. PREVENTIE EN BEHANDELING

4.7.1. Preventie

De meest voor de hand liggende en belangrijkste preventieve maatregel is het beperken van ijzer in het voeder en het vermijden van contaminatie van het voeder (door bijvoorbeeld contact met ijzerhoudende machines) (Clauss & Paglia, 2012; Klasing et al, 2012; Lavin, 2012). Ook de omgeving zoals de drinkbakken dienen ijzer-vrij te zijn (Mylniczenko et al., 2012). Nielsen et al. (2012) raden aan om insulineresistentie te voorkomen door middel van gewichtscontrole.

Voedervoorschriften:

- Het voeder mag een ijzerconcentratie van 50-100 mg/kg voeder op droge stof basis met maximaal 300 mg ijzer per kg per dag bevatten ofwel maximaal 6 gram ijzer per dier per dag. Het drinkwater dient gecontroleerd te worden op een maximale ijzerwaarde van 0,3 mg/kg (Clauss et al., 2012);
- Zo veel mogelijk browse, aangepast aan het seizoen met in de winter minder bladeren dan in de lente. Het browse wordt aangevuld met hooi bestaande uit een 1:1 verhouding van luzernehooi en grashooi (Dierenfeld et al., 1995). Luzernehooi wordt gezien de doorgaans hoge ijzergehalten best beperkt tot maximum 50 procent van de totale hoeveelheid hooi (Clauss et al., 2012). Dit kan gecombineerd worden met grashooi (Dierenfeld et al., 1995). Hooi met hogere concentraties aan tannines en andere polyfenolen genieten de voorkeur (Clauss et al., 2012). Vooral polyfenolen met veel hydroxylgroepen worden aangeraden gezien deze hydroxylgroepen het ijzer binden en men op die manier een maximale ijzerbinding wilt bereiken (Lavin, 2012). Voorgestelde bronnen van polyfenolensupplementen zijn houtextracten van Acaciasoorten en kastanje, thee, granaatappels (*Punica granatum*), veenbessen (*Vaccinium macrocarpon*) en geïsoleerd soya eiwit (Lavin, 2012). Zoals hoger aangehaald is het supplementeren van ijzerbinders zoals tannines en fyfaten een mogelijke preventieve maatregel die met enige voorzichtigheid moet aangewend worden. Er is meer onderzoek vereist naar de meest geschikte bronnen en doseringen (Clauss & Paglia, 2012; Helary et al., 2012; Klasing et al., 2012). Ijzerbinders kunnen verschillende negatieve effecten teweegbrengen waaronder het binden van andere mineralen waardoor tekorten kunnen ontstaan. Bovendien zijn ze vrij bitter van smaak (Klasing et al., 2012). De tannines dienen in combinatie met de ijzerbronnen gevoederd te worden en mogen nooit ter vervanging van een restrictie van ijzer in het dieet gebruikt worden (Clauss & Hatt, 2006; Helary et al., 2012);
- Pellets en supplementen mogen uitsluitend als aanvulling gegeven worden waar nodig om tekorten aan mineralen, vitaminen en eiwitten aan te vullen (Clauss & Hatt, 2006; Clauss et al., 2012). De pellets en

supplementen mogen geen extra ijzer of vitamine C bevatten (Clauss et al., 2012). Stoffen die de biologische beschikbaarheid van ijzer verhogen zoals ascorbinezuur (vitamine C), citroenzuur en andere organische zuren dienen vermeden te worden. De organische zuren zorgen dat ijzer in de darm hoofdzakelijk in de ferro-vorm (Fe^{2+}) voorkomt waardoor het gemakkelijker opgenomen wordt door de darm (Klasing et al., 2012).

- Als calcium en fosfaatbronnen worden bij voorkeur geprecipiteerd dicalciumfosfaat en monosodiumfosfaat gebruikt vanwege hun lage ijzergehalte. Antioxidanten in de pellets zijn een pluspunt om de potentiële oxidatiereacties door ijzerstapelings tegen te gaan (Clauss et al., 2012). Mineralen-supplementen met ijzer en calciumbronnen dienen vermeden te worden (Clauss & Paglia, 2012).
- Indien er zoutblokken gebruikt worden mag er uitsluitend gebruik gemaakt worden van wit zout met jodium gezien deze arm zijn aan ijzer, in tegenstelling tot de rode zoutblokken (Clauss et al., 2012).
- Uit een retrospectieve studie van de oorzaak en het voorkomen van ijzerstapelings bij de Sumatraanse neushoorn werd besloten dat deze dieren alleen mits een aanpassing van het dieet in gevangenschap gehouden kunnen worden. Dit houdt een grotere verscheidenheid aan browse in met seizoensgebonden variatie (Candra et al., 2012).

4.7.2. Behandeling

Aderlating en chelatietherapie hebben als doel het ijzergehalte in het lichaam op korte termijn te doen dalen. Algemeen wordt gesteld dat aderlating aangewezen is bij ijzerstapelingsziekte zonder anemie, en chelatietherapie bij ijzerstapelingsziekte met anemie (Fleming & Ponka, 2012).

Aderlating

Aderlating of flebotomie is een techniek waarbij een hoge hoeveelheid bloed afgenomen wordt om het ijzergehalte in het bloed te doen dalen (Clauss & Paglia, 2012). Door de plotse daling van de hoeveelheid rode bloedcellen wordt voor de aanmaak van hemoglobine voor nieuwe rode bloedcellen ijzer gemobiliseerd uit de weefsels. Dit gaat gepaard met een daling van het niet-transferrinegebonden ijzer in het bloed en weefsels (Fleming & Ponka, 2012).

Na aderlating bij ceruloplasmine negatieve muizen werd vastgesteld dat ijzer veel sneller vrijgesteld wordt uit de milt in vergelijking met de lever. Bij het voederen van een ijzerdeficiënt dieet aan muizen die aderlating ondergaan hadden werd daarentegen een gelijkmatige vrijstelling van ijzer uit milt en lever vastgesteld (Cherukuri et al., 2005). Na een aderlating kan het ferritinegehalte na enkele weken dalen (Mylniczenko et al., 2012).

Chelatietherapie

Chelatietherapie is het toedienen (parenteraal of oraal) van een ijzerbindende stof waarbij het complex afgevoerd wordt via de mest en/of urine na de ijzerbinding (Cornelissen et al., 1995). De chelatoren verwijderen niet alleen ijzer uit het lichaam maar binden ook labeel ijzer om de vorming van reactieve zuurstofverbindingen te voorkomen (Fleming & Ponka, 2012). Bij een groefsnaveltoekan (*Ramphastos vitellinus*) met ijzerstapelingsziekte werd de ijzerchelator deferoxamine ingespoten (Cornelissen et al., 1995). Deferoxamine is een siderfoor geïsoleerd uit *Streptomyces pilosus* (Aouad et al., 2002). Deze stof wordt na binding van ijzer afgevoerd via de mest en urine als ferrioxamine. Deferoxamine bindt niet met ijzer gebonden aan transferrine, hemoglobine of andere heemverbindingen. De ijzerconcentratie in de lever daalde na 4 maanden tot de normaalwaarde bij vogels (Cornelissen et al., 1995). In humane geneeskunde wordt naast deferoxamine ook deferiprone gebruikt (Beutler et al., 2003).

Bij zwarte neushoorns werd N,N-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N-diacetaat, kortweg HBED getest door Sullivan et al. (2014). Ze zagen een significante verhoging van de urinaire excretie van ijzer maar geen

verhoogde fecale uitscheiding. HBED leek het bloedijzergehalte te doen dalen bij het vrouwelijke dier met ijzerstapelingsziekte maar niet bij de geteste mannetjes zonder ijzerstapelingsziekte.

4.7.3. Opvolging

- De dieren moeten van dichtbij opgevolgd worden om symptomen op tijd op te merken (Clauss & Paglia, 2012)
- Controleer regelmatig ijzergehalten van het voeder en drinkwater uit de drinkbak. Er wordt aangeraden jaarlijks de ijzergehalten van hooi en pellets te controleren. Extra metingen zijn aangeraden wanneer er veranderd wordt van leverancier of de samenstelling van de pellets wijzigt. Voor water wordt een grenswaarde van 0,3 mg/kg opgelegd. Wanneer deze grens overschreden wordt dient het water gefilterd te worden (Clauss et al., 2012). Opeenvolgende metingen worden het best in hetzelfde labo uitgevoerd om geen rekening te moeten houden met metingsverschillen tussen laboratoria (Clauss et al., 2012).
- Ook bloedtesten zijn aangeraden. Serum ijzer, ferritine, transferrinesaturatie en ijzerbindingscapaciteit zijn belangrijke op te volgen parameters. Sporenelementen zijn een goede aanvulling hierop (Clauss et al., 2012). Deze metingen gebeuren bij voorkeur jaarlijks en aanvullend bij elke drastische verandering in voedersamenstelling en bij stresserende situaties zoals immobilisaties.
- Autopsie van ieder gestorven dier, al dan niet aangetast wordt aangeraden (Clauss & Paglia, 2012)

5. ANDERE FREQUENT VOORKOMENDE AANDOENINGEN BIJ DE ZWARTE NEUSHOORN, EEN OVERZICHT

Bij zwarte neushoorns in gevangenschap zijn hemolytische anemie, hepatopathie en ulceratieve dermatopathie de meest voorkomende chronische en tevens dodelijke ziekten. Het is niet duidelijk of het over verschillende ziekten gaat met verschillende oorzaken of dat deze syndromen aan elkaar, en aan ijzerstapelingsziekte gelinkt zijn. Deze ziekten komen steeds frequenter voor (Dennis et al., 2007) en kunnen zich ook voordoen bij recent gevangen dieren maar werden nog niet vastgesteld bij in het wild levende dieren (Miller, 1994). Ijzerstapelingsziekte zou de gevoeligheid voor infecties en voor het ontwikkelen van toxische hepatopathie en acute en chronische anemie verhogen (Paglia et al., 2001a). Ook hemolytische anemie, mucocutaan ulceratief syndroom en leukoencephalomalacie werden met ijzerstapelingsziekte in verband gebracht (Mylniczenko et al., 2012). Deze aandoeningen komen echter niet voor bij de browsende Sumatraanse neushoorn die wel aan ijzerstapelingsziekte lijdt (Paglia & Tsu, 2012).

5.1. HEMOLYTISCH SYNDROOM

Het hemolytisch syndroom of hemolytische anemie komt voor bij zwarte neushoorns in gevangenschap. Het is niet duidelijk of neushoorns in het wild de ziekte niet doormaken of de ziekte bij wilde dieren nooit opgemerkt wordt. Het gaat om een niet-immuungemedieerde regeneratieve lyse van rode bloedcellen (Miller, 1993). De ziekte kan primair zijn door opname van chemicaliën of medicatie zoals sulfonamiden, chloramfenicol of vitamine C en vitamine K analogen die voor een verhoogde oxidatieve stress kunnen zorgen. Hemolyse zou ook secundair aan infectieuze of ulceratieve ziekten kunnen ontstaan (Paglia et al., 1996).

Aangetaste dieren vertonen algemene zwakte, bleke slijmvliezen, spierrillingen en als meest opvallende symptoom rood gekleurde urine door hemoglobinurie. Tenslotte is er sterfte bij tot 75 procent (Paglia, 1994) van de aangetaste dieren. De hematocriet varieert afhankelijk van het ziektestadium tussen 4,5 en 43 procent. Bij post mortem onderzoek werd er microscopisch - op een HE kleuring - veel ijzerstapelings (> 3000

mg/kg) in verschillende organen gezien. In het beenmerg werd erythropoietische hyperplasie vastgesteld (Miller, 1993).

Etiologie

De oorzaak is nog niet bekend maar er zijn verschillende theorieën over welk mechanisme aan de basis van het hemolytisch syndroom zou kunnen liggen. Zowel metabole oorzaken als ijzerstapelingsziekte en infectie worden overwogen.

Een eerste theorie betreft een gebrek aan het enzym catalase. Catalase is een enzym dat reactieve zuurstofverbindingen kan neutraliseren. Neushoorns vertonen een lage catalase activiteit in vergelijking met andere diersoorten waardoor er al dan niet in combinatie met andere factoren oxidatieve stress kan ontstaan (Paglia et al, 1996).

Een tweede mogelijke oorzaak is (naar analogie met de mens) een tekort aan adenosinetrifosfaat (ATP) met oxidatieve stress in de rode bloedcellen tot gevolg. ATP heeft een functie in het neutraliseren van reactieve zuurstofverbindingen. Wanneer dit niet gebeurt sterven de rode bloedcellen door oxidatieve stress. Als dit het onderliggend mechanisme zou zijn is het nog niet duidelijk waardoor het ATP tekort dan veroorzaakt wordt (Paglia et al, 1996). Het ATP tekort kan gepaard gaan met hypofosfatemie (Dennis et al., 2007).

Een derde mogelijke metabole oorzaak van hemolyse is een tekort aan vitamine E. Het mechanisme hierachter is nog niet ontrafeld (Dennis et al., 2007).

Ijzerstapeling zou een vierde oorzaak kunnen zijn gezien ijzerionen lyse van rode bloedcellen kunnen veroorzaken (Paglia & Dennis, 1999).

Als infectieuze oorzaak wordt Leptospirose voorgesteld (Miller, 1993). Dit vermoeden is gebaseerd op bloedtesten maar niet bevestigd met bacteriële cultuur wat uitsluitel zou kunnen geven (Dennis et al., 2007).

Behandeling

Fosfaat kan toegediend worden om het ATP gehalte te verhogen of als preventieve maatregel. Preventief is het belangrijk bepaalde medicatie en chemicaliën te mijden die de productie van oxidanten in de hand werken zoals sulfonamiden, nitrofuranen, chloramfenicol en mogelijk vitaminen K en C. Wat chemicaliën betreft worden cyclische koolwaterstoffen zoals fenolen en creosoot afgeraden (Paglia et al., 1996).

In het geval van leptospirose bestaat de behandeling uit antibiotica zoals penicillines, aminoglycosiden of tetracyclines en vitamine E gezien dieren in gevangenschap hier een ernstig tekort aan hebben. Bij ernstige hemolyse kan een bloedtransfusie overwogen worden (Miller, 1993).

5.2. MUCOCUTAAN ULCERATIEF SYNDROOM

Het mucocutaan ulceratief syndroom is een huidaandoening met ongekende oorzaak (Miller, 1994). Samen met acute intravasculaire hemolyse is dit de meest voorkomende doodsoorzaak bij zwarte neushoorns (Paglia & Tsu, 2012). De ziekte start met verheven plaques op beschadigde of perifere huiddelen die evolueren naar vesikels en vervolgens bullae en ulcera in het chronisch stadium (Miller, 1994; Munson et al., 1998). De letsels bevinden zich typisch bilateraal symmetrisch en voornamelijk op drukpunten, mucocutane overgangen (lippen), in de mondholte (tong (zie figuur 11) en gehemelte), de kroonranden van de poten, op de flanken en de rug (figuur 9). De letsels kunnen zich uitstrekken over een groot huidoppervlak (Miller, 1994; Munson et al., 1998). Meestal gaat de ziekte gepaard met lethargie en gewichtsverlies soms gevolgd door sterfte (Munson et al., 1998).

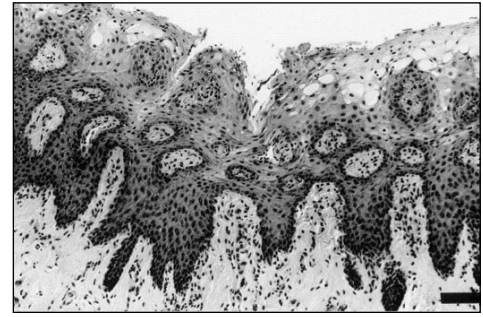
De laesies zijn van degeneratieve aard zonder ontsteking (Munson et al., 1998). Ze worden histologisch gekenmerkt door acanthose (hyperplasie van de epidermis (Zheng et al., 2006)), hydropische degeneratie



Figuur 9



Figuur 10



Figuur 11

Figuur 9. Vesiculaire huidletsels en chronische ulceratieve laesies op flanken, heupen, knieën en spronggewrichten. Uit Munson et al, 1998.

Figuur 10. Ulcera op de laterale randen van de tong die contact hebben met de tanden. Uit Munson et al, 1998.

Figuur 11. Histologisch preparaat van huidlaesies secundair aan toxische hepatopathie. De epidermis vertoont acanthose, hydropische degeneratie van het stratum spinosum, hypogranulose en para-keratotische hyperkeratose. Uit Munson et al, 1998.

van keratinocyten in het stratum spinosum, spongiose en intraepitheliale vesikels (Munson et al., 1998). Histologisch (Figuur 10) spreken we van een oppervlakkige necrotiserende dermatitis (Miller, 1994).

Meestal gaat de ziekte gepaard met episodes van stress (transport, plotse koude, oestrus, dracht of door interactie met dier of mens) of ziekte (hemolytische anemie, toxische hepatopathie en infecties van het ademhalingsstelsel en urinewegen). Er werden geen pathogenen geïsoleerd uit de letsels (Munson et al., 1998). In sommige gevallen werd hypofosfatemie gezien (Munson et al., 1998). Gezien de epidermis gevoelig lijkt voor verschillende acute metabole veranderingen wordt vermoed dat een gebrekkige adaptatie aan het leven in gevangenschap of fouten in het dieet aan de basis van de ziekte liggen (Munson et al., 1998). De letsels doen denken aan oppervlakkige necrotiserende dermatitis bij de hond en necrotisch migrerend erytheem bij mens maar de oorzaken van deze aandoeningen kunnen niet gelinkt worden aan de letsels bij de neushoorns (Dennis et al., 2007).

Als de letsels niet spontaan helen is een corticoïd therapie mogelijk met als belangrijkste risico het ontwikkelen van schimmel pneumonie (Miller, 1994).

5.3. TOXISCHE HEPATOPATHIE

Toxische hepatopathie is een leveraandoening waarbij de lever acuut beschadigd wordt. Hoewel de benaming doet uitschijnen dat het om een vergiftiging gaat is daar nog enige twijfel over (Dennis et al., 2007). Het toxine waarmee toxische hepatopathie doorgaans geassocieerd wordt is creosoot, een middel om telefoonpalen te behandelen die als omheining gebruikt worden. Creosoot zou in sommige gevallen acuut leverfalen veroorzaakt hebben met anemie, geelzucht, ulceratieve huidletsels en sterfte tot gevolg (Schmidt et al., 1982). Bij nader onderzoek van de huidletsels werd een endotheliale proliferatie gezien waardoor bloedvaten als het ware toegeduwd worden. Op autopsie is de lever groenbruin verkleurd door galpigment (Schmidt et al., 1982).

Bij twee groepen dieren die niet lang voor het optreden van de ziekte getransporteerd werden van Zimbabwe naar Australië en de Verenigde Staten werden gelijkaardige letsels gezien (Kock et al., 1994; Kelly et al., 1995). De dieren hadden een vergrote, broze en intens groen verkleurde lever met bilirubine in de hepatocyten. Een deel van deze dieren had gezwollen ledematen die bij fijne naald aspiratie bloed bevatten (Kelly et al., 1995). Op autopsie bleken het bloedingen in de spieren en subcutis te zijn. De dieren in de VS

stierven na geelzucht, lethargie en huidulcera. Alle dieren vertoonden anemie en hypofosfatemie. Hoewel alle dieren blootgesteld waren aan creosoot in Zimbabwe werden sommigen pas een jaar na hun verhuis ziek door acuut leverfalen (Kelly et al., 1995).

5.4. LEUKOENCEPHALOMALACIE

Leukoencephalomalacie is een ziekte die neurologische symptomen geeft en beschreven wordt bij jonge dieren. Aangetaste dieren vertonen onder meer ataxie, eenzijdige headpressing en cirkelen, vocaliseren, overgevoeligheid ten opzichte van de omgeving, speekselen, smakken, blindheid en tenslotte coma (Dennis et al., 2007).

Na pathologisch onderzoek blijken vooral de grote hersenen, en in mindere mate de middenhersen en tussenhersen betrokken te zijn (Miller et al., 1990). Er werden ook letsels aan de huid en bloedvaten gezien. De huidletsels betreffen ulceraties ter hoogte van de nek, rug en flanken. De bloedvaten vertoonden focaal necrotiserende vasculitis met bloedingen (Miller et al., 1990).

Er heerst een sterk vermoeden dat ijzerstapeling bij pasgeboren neushoorns veroorzaakt kan worden door transplacentale passage van ijzer. De hydroxylradicalen en andere reactieve zuurstofverbindingen veroorzaakt door de ijzerstapeling zouden kunnen interfereren tijdens cruciale fasen in de ontwikkeling van het centraal zenuwstelsel (Paglia & Tsu, 2012).

Paglia et al. (2001) testten het bloed van 18 familieleden van aangetaste kalveren op ferritine. Hierbij zagen ze dat 14 dieren een ferritinegehalte hadden dat hoger lag dan 42 van de 46 niet aangetaste neushoorns in gevangenschap. Een van de moederdieren had een serum ferritine gehalte dat een honderdvoud hoger lag dan bij neushoorns in het wild. Een neonataal bloedstaal van een aangetast vrouwelijk kalf vertoonde een vergelijkbare ferritineconcentratie. Een mannelijk kalf afkomstig van dezelfde moeder vertoonde geen gestegen ferritineconcentratie wat doet vermoeden dat er een geslachtspredispositie is voor de foetale respons op ijzerstapeling bij het moederdier. Een andere conclusie was dat de familieleden van aangetaste dieren hogere ijzerwaarden hebben dan de rest van de zwarte neushoornpopulatie in gevangenschap. Het zou echter kunnen dat het verschil in ijzergehalte te wijten is aan het verschil in leeftijd tussen de aangetaste familieleden (gemiddeld 19,7 jaar oud) en de niet aangetaste testpopulatie (gemiddeld 9,3 jaar oud). Er werd immers een link gelegd tussen de mate van ijzerstapeling en de tijd dat een dier in gevangenschap leeft (Smith et al., 1995).

Daarenboven zou het kunnen dat de leeftijd van het moederdier een rol speelt in het ontwikkelen van leukoencephalomalacie. Er moet ook rekening gehouden worden met het feit dat ferritine een acute fase eiwit is en louter door een ontstekingsreactie gestegen kan zijn (Dennis et al., 2007). Desalniettemin is het vermijden van ijzerstapeling een goede management strategie naar verscheidene aandoeningen toe (Paglia et al., 2001b).

6. DISCUSSIE

Tannines om de ijzeropname te verlagen

Uit de studie van Ward & Hunt (1989) bleek dat de dieren die de hoogste proportie browse opnamen de laagste serum ferritine concentratie hadden maar dit browse bevatte niet het hoogste aandeel aan tannines. De ijzerbepaling van het voeder gebeurde slechts op één moment waardoor seizoensgebonden variaties niet meegerekend werden. Moesten deze metingen wel representatief zijn voor de ijzeropname doorheen het ganse jaar zou men kunnen vermoeden dat een laag ijzergehalte belangrijker is dan een hoog tanninegehalte om ijzerstapeling te voorkomen. Candra et al. (2012) hebben echter het vermoeden dat het omgekeerde waar is.

Fysiologie

Er zijn verschillende wegen voor ijzeropname door cellen (via transferrine opname of divalent metal transporter 1), maar er is slechts 1 ijzer exporter, ferroportine (Aigner et al., 2008). Wanneer ferroportine uitgeschakeld wordt stapelt ijzer zich op in hepatocyten, enterocyten en macrofagen (Ganz, 2011). Een backupmechanisme dat dit proces tegengaat werd nog niet gevonden. Onderzoek is nodig om uit te maken of dit bij neushoorns de zwakke schakel kan zijn.

Gezien in vergelijking met paarden een kopertekort vastgesteld werd in de lever van browsende neushoorns is verder onderzoek naar het ijzer- en kopermetabolisme bij neushoorns meer dan welkom (Dierenfeld et al., 2005)

Oorzaken

Het gebruik van het paard als model om de link met insulineresistentie aan te tonen heeft enkele nadelen. Zo is het natuurlijke dieet van paarden gras en van zwarte neushoorns browse (Nielsen et al., 2012). In sommige zoos echter bestaat het dieet van de zwarte neushoorns net als paarden voornamelijk uit hooi (Candra et al., 2012).

Diagnose

Voor de bepaling van de ijzerstatus van neushoorns wordt beroep gedaan op de ideale waarden beschreven voor paarden gezien deze gegevens voor de neushoorns voorlopig ontbreken. Er is geen zekerheid dat de waarden beschreven voor paarden een goede weergave zijn van die van neushoorns (Smith et al., 1995). Daarom is het belangrijk te weten wat de ideale ijzer- en koperwaarden zijn bij neushoorns. Hiervoor zou gebruik gemaakt kunnen worden van asymptotische gezonde dieren in het wild. Bij vergelijking van parameters van dieren in gevangenschap en in het wild levende dieren is het belangrijk er niet blind vanuit te gaan dat de waarden gemeten bij dieren in het wild de ideale waarde voor de diersoort weerspiegelen maar wel een waarde waarnaar de diersoort geëvolueerd is (Clauss & Paglia, 2012).

Bij de bepaling van het serum ferritinegehalte dient er rekening gehouden te worden met het feit dat ferritine een positief acute fase eiwit is en dat ontsteking en erge leverziekte de interpretatie van de ijzerstatus van het dier kunnen beïnvloeden (Prieto et al., 1975; Smith et al., 1995).

De Indische neushoorn was oorspronkelijk een browser die zich doorheen zijn evolutie heeft aangepast aan een grasdieet. Daarenboven produceren Indische neushoorns, net als zwarte neushoorns, tannine bindende speekseiwitten om tannines onschadelijk te maken (Clauss et al., 2005a). Sommige tannines zijn in staat ijzer, koper en andere mineralen te binden (Helary et al., 2012). Uit de studie van Olias et al. (2012) is gebleken dat ook Indische neushoorns ijzerstapelingsziekte kunnen ontwikkelen in gevangenschap. Uit al deze gelijkenissen tussen zwarte en Indische neushoorns zouden we kunnen afleiden dat er een genetische basis kan zijn voor het ontwikkelen van ijzerstapelingsziekte.

Preventie en therapie

Het is voor zoos moeilijk om ieder seizoen aan voldoende en gevarieerd browse te geraken. Zowel de kosten, arbeid en de beschikbaarheid spelen hierbij parten (Mylniczenko et al., 2012). Ook rijst de vraag of de fysische vorm van het dieet een invloed heeft op de beschikbaarheid van tannines en polyfenolen (Lavin, 2012).

De supplementatie van tannines vergt verder onderzoek. Onder meer naar het effect van verschillende tannines, bovenop de door Clauss et al (2007a) geteste quebracho en tanninezuur op de verteerbaarheid bij browsende neushoorns. Resultaten van andere diersoorten mogen niet geëxtrapoleerd worden gezien tannines diersoortspecifieke effecten kunnen hebben. Ook hebben natuurlijke tannines andere effecten dan commercieel tanninezuur. Het moleculair gewicht zou een bepalende factor zijn voor de effecten (Hagerman et al., 1992). Een eigen bemerking is dat als men tannines wil gebruiken om het ijzergehalte in het voeder te verlagen, men ook een kopertekort zou kunnen induceren. Dit kan dan wel gesupplementeerd worden. Men weet echter nog niet wat het effect is van de binding van tannines met speekseliwitten op de biologische beschikbaarheid van ijzer en koper.

Hoewel aderlating en chelatietherapie goede effecten hebben dient bij beide therapieën omzichtig gewerkt te worden. Eerst en vooral zouden beide technieken slechts bij recent aangetaste (meestal jonge) dieren effect kunnen hebben gezien deze technieken niet opgewassen zijn tegen de hoge ijzerconcentraties bij gevorderde (meestal oude) gevallen (Paglia & Dennis, 1999). Chelatietherapie heeft ten opzichte van aderlating het voordeel dat er geen anemie geïnduceerd wordt. Men moet ook rekening houden met de mogelijke toxiciteit van chelatoren (Miller & Fowler, 2014). Enkele eigen bemerkingen zijn ten eerste of in het kader van dierenwelzijn de immobilisatie bij chelatie minder lang duurt dan bij aderlating. Ten tweede, vereist chelatietherapie een levenslange behandeling bij neushoorns en zal een feedbacksysteem niet leiden tot een verhoogde intestinale resorptie?

Aderlating is slechts een oplossing op korte termijn waarmee het onderliggend probleem niet opgelost wordt. Een tweede nadeel van deze techniek is dat de expressie van hepcidine daalt wanneer er een verhoging is aanmaak van rode bloedcellen door hemolyse en aderlating. Hierdoor ontstaat een verhoogde ijzeropname door de enterocyten (Fleming & Ponka, 2012).

Toxische hepatopathie

Volgens Schmidt et al. (1982) wijst de acute leverdegeneratie bij de door hen beschreven gevallen op een intoxicatie met creosoot. Bij de dieren die (sommigen pas een jaar later) na export ziek werden en tekenen vertoonden van acute hepatopathie lijkt een creosoot intoxicatie minder waarschijnlijk (Dennis et al. 2007). De vraag is of het hier om twee verschillende aandoeningen gaat of dat de dieren die stierven na export het slachtoffer geworden zijn van een andere intoxicatie.

Het komt er dus op neer dat er snel een oplossing dient gevonden te worden voor ijzerstapelingsziekte, zowel naar preventie van nog niet aangetaste dieren als de behandeling van de aangetaste dieren. Het alternatief is diersoorten die gevoelig zijn om ijzerstapelingsziekte te ontwikkelen niet meer te houden in gevangenschap, een moeilijke afweging naar het behoud van de soort toe.

DEEL II - ONDERZOEK

1. SAMENVATTING

Er is nog veel onontgonnen terrein wat betreft wetenschappelijk onderzoek naar ijzerstapelingsziekte bij neushoorns. In dit onderzoek willen we enkele hypothesen testen, namelijk of er een relatie bestaat tussen obesitas en een te laag kopergehalte enerzijds, en ijzerstapelingsziekte anderzijds. Hiervoor bepalen we de ijzer- en koperstatus van zwarte, Indische en witte neushoorns op basis van de ijzer-, koper-, ceruloplasmine- en hepcidinegehalten, aangevuld met triglyceridegehalten en leptinetiters als parameters voor obesitas in het bloed en vergelijken de resultaten. Daarnaast zullen ook de koper- en ijzergehalten in het voeder worden nagegaan en kijken of er een link is met de ijzer- en koperstatus. De gemiddelde bloed ijzer- en kopergehalten van drie Indische (Fe= 104 ± 60 µg/dl, Cu= 245 ± 130 µg/dl) en drie zwarte neushoorns (Fe=249 ± 76 µg/dl, Cu=126 ± 27 µg/dl) werden reeds bepaald. Het gemiddelde ijzergehalte verschilt significant tussen beide groepen dieren. De hogere gemiddelde ijzertiter bij de zwarte neushoorns is waarschijnlijk te correleren aan de grotere problemen met ijzerstapelingsziekte bij deze groep, en is moeilijker door soortverschillen te verklaren. Daarnaast wijzen de gemiddelde koperwaarden in de richting van een lager gehalte bij de zwarte neushoorns. Zowel de gemeten numerieke koperwaarden als de koperwaarden uit de literatuur van Indische neushoorns liggen hoger dan de range voor paarden. In tegenstelling tot wat we verwachtten door hun problemen met ijzerstapeling vallen de koperwaarden van de zwarte neushoorns binnen de range voor paarden, mogelijk door een hogere koperbehoefte dan de Indische neushoorn.

2. INLEIDING

De browsende zwarte (*Diceros bicornis*) en Sumatraanse (*Dicerorhinus sumatrensis*) neushoorns zijn het meest gevoelig om ijzerstapelingsziekte te ontwikkelen in gevangenschap. Bij de grazende Indische neushoorn (*Rhinoceros unicornis*) zijn enkele gevallen bekend terwijl de witte neushoorn (*Ceratotherium simum*) hier ongevoelig voor blijkt te zijn. Het onderliggend mechanisme is echter nog onbekend.

De hypothese in dit werk is dat ijzerstapelingsziekte in gevangenschap door stress in een suboptimale huisvesting kan ontstaan. Het ijzer dat hierdoor in de lever en macrofagen wordt opgeslaan zou dan moeilijk vrijgesteld worden door de combinatie van een laag kopergehalte en een hoog hepcidinegehalte door overgewicht. We hebben dus te maken met drie oorzakelijke factoren: stress, een te laag kopergehalte en overgewicht. Stress zou vermoedelijk, net zoals iedere andere factor die een acute fase respons kan uitlokken ijzerstapeling teweeg kunnen brengen (Ganz et al., 2012). Het hoog hepcidinegehalte zou door overgewicht kunnen ontstaan. Bij obese kinderen werden significant hogere hepcidineconcentraties gemeten in vergelijking met niet-obese kinderen. Obesitas zorgt immers voor een chronische milde ontstekingsreactie, wat de vrijstelling van hepcidine kan stimuleren (Aeberli et al., 2009). Dit verband werd nog niet aangetoond bij neushoorns. Hoewel hier meer onderzoek naar vereist is, lijken witte neushoorns echter gevoeliger te zijn voor het ontwikkelen van obesitas in gevangenschap dan zwarte neushoorns (Claus & Hatt, 2006). Een te laag kopergehalte van het voeder zou de oorzaak van een kopertekort kunnen zijn (Ganz et al., 2012). Koper is een belangrijke co-factor voor het enzym ceruloplasmine, een ferroxidase dat essentieel is voor de export van ijzer uit cellen door ferroportine. Dit is tevens een belangrijke link tussen het koper- en ijzermetabolisme (Vulpe et al., 1999, Cherukuri et al., 2005). Een laag kopergehalte maakt ceruloplasmine inactief, maar verlaagt de ceruloplasmineconcentratie niet en zou op die manier de vrijstelling van ijzer uit macrofagen en ijzerstapelende organen zoals de lever verhinderen (Ganz et al., 2012).

Gezien een te hoge opname van ijzer de belangrijkste oorzaak van ijzerstapelingsziekte wordt geacht, wordt voorgesteld om tannines aan het voeder toe te voegen omwille van hun mineralenbindende eigenschappen (Lavin, 2012). Een vereenvoudigde test om de tannine-mineralen binding te bepalen gebaseerd op de spectrofotometrische methode van Verleye (2016) waarmee de tannine-eiwitbinding bepaald wordt zou hiervoor welkom zijn.

3. MATERIALEN EN METHODEN

3.1. Verzamelen van de stalen

We hebben gebruik gemaakt van voeder- en drinkwaterstalen, meststalen en bloedstalen (serum en plasma) van zwarte, witte en Indische neushoorns in gevangenschap. De stalen zijn afkomstig uit Planckendael (Muizen, BE), Safaripark Beekse Bergen (Hilvarenbeek, NL), Diergaarde Blijdorp (Rotterdam, NL) en Chester Zoo (Chester, VK). De stalen van Safaripark Beekse Bergen en Diergaarde Blijdorp werden samen met de verzorgers verzameld. De stalen van Planckendael werden door de verzorgers verzameld en vervolgens opgehaald. De grootste groep stalen werden in Chester verzameld maar zijn door administratieve problemen nog niet in het labo geraakt. Initieel was het de bedoeling de ijzerstatus van zoodieren te vergelijken met opportunistische bloedstalen uit het wild. De stalen werden bekomen in Zuid-Afrika maar wegens moeilijkheden met de export- en importvergunningen konden de stalen niet in België geraken. Tabel 1 geeft een overzicht van de verzamelde stalen.

Tabel 1. Overzicht stalen

| | Zwarte neushoorn Blijdorp | Zwarte neushoorn Chester Zoo | Indische neushoorn Planckendael | Witte neushoorn Beekse Bergen |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Serum | 6 (plasma) | 6 | 3 | 0 |
| Voeder (1 staal per onderdeel) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Drinkwater | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Feces | 3 | 1 | 2 | 7 |

3.2. Eigenschappen van de stalen

Alle stalen werden vers opgehaald en getransporteerd op droogijs. Vervolgens werden ze in een vriezer bewaard tot het ogenblik van de analyses.

3.2.1. Stalen zwarte neushoorns Blijdorp

- Plasma- en meststalen van zwarte neushoorns Wanda (V, 18 jaar), Vungu (M, 16 jaar) en Naima (V, 4 jaar).
- Voeder
 - Krachtvoer
 - Hooi
 - Stro
 - Snoepjes
 - Planten: bruidsbloem, rozenblaadjes, goudenwilg, elba, esdoorn
 - Drinkwater: waterleidingen bestaan uit koper.

3.2.2. Stalen zwarte neushoorns Chester

- Serumstalen van 6 zwarte neushoorns
- Voeder- en waterstalen van het huidige dieet
- Een meststaal van een van de neushoorns waarvan we ook een serumstaal hebben.

3.2.3. Stalen Indische neushoorns Planckendael

- 3 serumstalen
 - Johanna (V, 34 jaar) genomen op 25/5/2011;
 - Zutuma (V, gestorven op de leeftijd van 40 jaar) bloed afgenomen en gestorven op 01/12/2011, sterftedatum;
 - Bheema (M, gestorven op de leeftijd van 16 jaar) bloed afgenomen en gestorven op 22/10/1999, sterftedatum;
- Meststalen van Johanna en Karamat (V, 6 jaar) van donderdag 19/11/2015
- Voederstalen van Johanna en Karamat van donderdag 19/11/2015
 - De voedersamenstelling is gebaseerd op een gewicht van 1500 kg met het paard als model. Momenteel zijn de dieren veel te vet met hun 2000 kg. De neushoorns krijgen hooi en stro aangevuld met een mineralensupplement en dagelijks een appel.

3.2.4. Stalen witte neushoorns Beekse Bergen

- 7 meststalen, verzameld op 9/3/2016
- Voederstalen en -schema
 - 1 baal hooi per dier per dag die ad libitum gegeven wordt en afgestemd is op de hoeveel die ze de vorige dag hebben laten liggen
 - Paardenkorrels, 2 types:
 - 1 veulenkorrel met meer eiwit voor jongen en lacterende dieren
 - standaardkorrel voor de stier
 - Er zijn neushoornkorrels beschikbaar maar ze worden niet gebruikt gezien de dieren het algemeen goed doen op de huidige voeding.
 - Biotine: 15g per dier per dag
 - Snoepjes gebruikt voor training. De hoeveelheid varieert van dag tot dag van 0 tot 10 eenheden.
 - Water: de waterleidingen bestaan uit kunststof maar de laatste 20 cm aan de drinkbak bestaat uit koper.

3.3. Verwerking van de stalen

3.3.1. Bloedstalen

Uit de serum- en plasmastalen bepalen we de ijzerstatus van de dieren. Hiervoor wilden we ijzer, koper, triglyceriden, ceruloplasmine, hepcidine en leptine bepalen. Voor de bepaling van hepcidine en leptine zijn we op enkele hindernissen gestoten. De hepcidineconcentratie hebben we niet kunnen bepalen omdat dit een zeer diersoortspecifieke en kleine molecule is. Uit persoonlijke communicatie met Marcus Clauss (lid van de internationale werkgroep rond ijzerstapeling bij neushoorns) bleek dat de huidige test te veel cross-reactiviteit vertoont en daarom onbetrouwbare resultaten geeft. Voor de leptinebepaling zouden we gebruik maken van een multispecies kit. Ook bij deze methode zat teveel variatie in de analyses om betrouwbaar te kunnen zijn. Hierdoor resten ons resultaten van het ijzer-, koper-, ceruloplasmine en triglyceridgehalte van de dieren. Deze laatste parameters vergelijken we tussen de drie onderzochte soorten onderling alsook met de referentiewaarde voor paarden. Hier is vooral het kopergehalte interessant.

3.3.2. Voederstalen

Het doel van de voeder- en drinkwaterstalen is na te gaan in welke mate het dieet in gevangenschap het dieet in het wild benadert en of dat verschil groter is bij grazende dan bij browsende neushoorns. Hiervoor bepalen we de ijzer- en kopergehalten.

Wegens problemen met onze vriesdroger heeft de analyse vertraging opgelopen.

3.3.3. Meststalen

Ook de ijzer- en kopergehalten van de meststalen worden geanalyseerd om een idee te krijgen over de hoeveelheid opgenomen ijzer en koper.

3.3.4. Statistische analyse

Grafische boxplotanalyse wees uit dat ondanks het kleine aantal stalen, de groepen toch een normale verdeling toonden, zodat variantieanalyse mogelijk was. Voor de zekerheid werd ook een non-parametrische analyse uitgevoerd, die tot dezelfde conclusies leidde. Daarom wordt hieronder enkel de variantieanalyse weergegeven.

Een variantieanalyse werd uitgevoerd met zowel de factor zoo versus literatuur (zowel zoo als wild) als de factor locatie (Planckendael versus Blijdorp versus literatuur). Telkens werd de analyse uitgevoerd inclusief en exclusief de waarden voor witte neushoorns in het wild.

4. RESULTATEN

Op het moment van indienen zijn nog niet alle stalen verwerkt. De resultaten van de nog niet verwerkte stalen zullen wel aan bod komen in de verdediging.

4.1. Serum- en plasmastalen

In tabel 2 wordende ijzer- en koperwaarden in het bloed weergegeven, zowel eigen metingen als literatuurwaarden. In tabel 3 worden dezelfde resultaten na statistische analyse weergegeven.

4.1.1. Verschillen tussen dierentuinen en literatuurdata

Variantieanalyse met als factor zoo versus literatuurdata.

- exclusief witte neushoorns

Fe: $P = 0,711$

Cu: $P = 0,417$

- inclusief witte neushoorns

Fe: $P = 0,416$

Cu: $P = 0,648$

Variantieanalyse met als factor locatie (Planckendael, Blijdorp, literatuur).

- exclusief witte neushoorns uit het wild

Fe: $P = 0,066$

Cu: $P = 0,094$

- inclusief witte neushoorns uit het wild

Fe: P = 0,044

Cu: P = 0,119

Tabel 2. Ijzer- en kopergehalten in serum/plasma

| Blijdorp zwarte neushoorn Plasma (eigen metingen) | Fe (µg/dl) | Cu (µg/dl) |
|---|---|-----------------------|
| Naima (10/9/2015) | 206 | 94,4 |
| Vungu (4/8/2015) | 305 | 113,9 |
| Wanda (20/1/2015) | 304 | 158,2 |
| Naima (21/5/2015) | 196 | 102,2 |
| Vungu (22/5/2015) | 336 | 135,1 |
| Wanda (21/5/2015) | 147 | 153,5 |
| Planckendael Indische neushoorn Serum (eigen metingen) | Fe (µg/dl) | Cu (µg/dl) |
| Zutuma (1/12/2011) | 100 | 150,2 |
| Johanna (25/5/2011) | 165 | 191,1 |
| Bheema (22/10/1999) | 46 | 393,6 |
| Referentie- en literatuurdata | Fe (µg/dl) | Cu (µg/dl) |
| Aanbevolen waarde voor paarden | 50 -198 ^a | 64 - 191 ^c |
| Zwarte neushoorn in het wild | 83 ± 32 ^a 215 ± 61 ^b | 149 ± 44 ^b |
| Sumatraanse neushoorn in gevangenschap | 286 ± 77 ^b | 297 ± 70 ^b |
| Indische neushoorns in gevangenschap | 130 ± 19 ^b | 200 ± 49 ^b |
| Witte neushoorn in het wild | 64 ± 11 ^a 177 ± 66 ^b | 116 ± 15 ^b |

^a:Paglia & Tsu, 2012; ^b:Dierenfeld et al., 2005; ^c:Vossen J.P.H.M.

Tabel 3. Serum- en plasmaconcentraties van Fe en Cu in neushoorns in zoos (eigen metingen) en literatuurdata.

| | Fe (µg/dl) | Cu (µg/dl) |
|--|------------------------|------------|
| Zwarte neushoorns Blijdorp (6 stalen van 3 dieren) | 249 ± 76 ^b | 126 ± 27 |
| Indische neushoorns Planckendael (3 stalen van 3 dieren) | 104 ± 60 ^a | 245 ± 130 |
| Browsende neushoorns literatuur | 179 ± 84 | 215 ± 79 |
| Alle neushoorns literatuur | 159 ± 90 ^{ab} | 191 ± 75 |

^{a,b} Verschillende superscripts duiden op een significant verschil binnen een kolom bij P < 0,05.

Een Tukey post-hoc test wijst uit dat het significante verschil in Fe hier te wijten is aan de significant hogere waarde voor de Blijddorp dieren dan voor de Planckendael dieren. De waarden uit de literatuur zijn intermediair.

4.2.Voeder- en meststalen

De analyseresultaten en interpretatie van de voeder- en meststalen volgen in de presentatie.

5. BESPREKING

De concentraties van Fe en Cu wijken niet systematisch af tussen eigen metingen en literatuurbedata. Er zijn eerder belangrijke verschillen tussen Planckendael en Blijddorp waar te nemen. Dit kan in theorie liggen aan soortverschillen, maar dat is eerder onwaarschijnlijk omdat de literatuurbedata niet in dezelfde richting wijzen als de eigen metingen op dat vlak. Een betere aanname lijkt dan dat de hogere ijzertiter in Blijddorp ten opzichte van Planckendael correspondeert met de grotere problemen met ijzerstapelingsziekte in Blijddorp. Voor koper werden geen significante verschillen gevonden, maar het is toch meldenswaardig dat de statistische tendens wijst in de richting van lagere koperconcentraties in Blijddorp. Vraag is of de stalen uit Chester Zoo dit zullen bevestigen. In deze zoo zijn immers ook vrij veel problemen met ijzerstapelingsziekte. Afgaand op de numerieke waarden (wegens te weinig data voor statistische vergelijking) is het wel opmerkelijk dat de gevonden koperconcentraties zowel in de literatuur als in Planckendael hoger zitten dan de referentiewaarden voor paard, terwijl Blijddorp wel in de range voor paarden valt, terwijl hier wel de meeste problemen waren. Een mogelijke verklaring hiervoor is een hogere behoefte aan koper voor vooral de browsende neushoorns. Literatuurbedata vonden geen systematisch verschil in Fe- en Cu-concentraties tussen browse en gras, maar meer inzicht is nodig in de beschikbaarheid van Cu en Fe uit beide voedertypes voor neushoorns: enerzijds beschikt de zwarte neushoorn over tanninebindende speeksel-eiwitten die de invloed van tannines in browse dus zullen beperken, maar de vraag is in welke mate andere fysiologische verschillen tussen browse en andere voederbestanddelen meespelen.

Gezien de logistieke hindernissen en de beperkte omvang van dit onderzoek kunnen geen strikte besluiten genomen worden, maar deze studie heeft wel interessante hypothesen gegenereerd voor verder onderzoek, zoals de vraag of een hogere koperbehoefte een aspect kan zijn in de pathologie van ijzerstapelingsziekte bij browsende neushoorns in gevangenschap.

Om het effect van de toevoeging van tannines aan het voeder op de biologische beschikbaarheid van ijzer en koper te kunnen nagaan hebben we nood aan een methode om de aanwezigheid van mineralenbindende tannines in het voeder na te gaan en de tannine-mineralenbinding te kwantificeren. Op deze manier kunnen we nagaan welke gewassen in aanmerking komen om een verlaging van de biologische beschikbaarheid van ijzer teweeg te brengen. Er werd een vereenvoudigde methode ontwikkeld om de binding van eiwitten (het bekendste antinutritionele effect van tannines (Kumar, 1991)) met tannines te kwantificeren (Verleye, 2016). Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van spectrofotometrie, in de eerste fase de totale hoeveelheid (gecondenseerde + hydrolyseerbare) tannines bepaald door de binding met een tanninebindend polymeer polyvinyl- polypyrrolidone (PVPP). Vervolgens wordt door gebruik te maken van een butanol-HCl reagens de hoeveelheid gecondenseerde tannines bepaald. De hoeveelheid hydrolyseerbare tannines wordt berekend uit het verschil tussen de totale hoeveelheid tannines en de hoeveelheid gecondenseerde tannines. Tenslotte wordt de mate van eiwitbinding gemeten gebaseerd op de binding met bovine serum albumine (BSA). Hierbij wordt de totale hoeveelheid BSA-eiwit dat gebonden wordt door de aanwezige

hydrolyseerbare en gecondenseerde tannines bepaald. Deze methode zou eventueel aangepast kunnen worden om de tannine-mineralenbinding te bepalen.

Om het plaatje te vervolledigen zou een in-vitro test om het effect van tanninebindende speekseiwitten op de tannine-ijzer binding te bepalen interessant kunnen zijn. Gezien tannine bindende speekseiwitten van zwarte en Indische neushoorns een gelijkaardige tanninebindingscapaciteit hebben en Indische neushoorns deze eiwitten continu produceren (ook zonder de aanwezigheid van tannines in het voeder) zouden we dat met speeksel van de Indische neushoorn kunnen testen. Het is echter beter de gewenste diersoort zelf te gebruiken omwille van mogelijke functionele verschillen van de tannine bindende speekseiwitten.

DEEL III - REFERENTIES

1. Adams R.S., 1975. Variability in mineral and trace-element content of dairy-cattle feeds. *J. Dairy Sci.* **58**, 1538-1548. Amin R., Thomas K., Emslie R.H., Foose T.J., Van Strien N., 2006. An overview of the conservation status of and threats to rhinoceros species in the wild. *Int. Zoo Yb.* **40**, 96-117.
2. Aeberli I., Hurrell R.F., Zimmermann M.B., 2009. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. *International Journal of Obesity* **33**, 1111-1117.
3. Aigner E., Theurl I., Haufe H., Seifert M., Hohla F., Scharinger L., Stickel F., Murlane F., Weiss G., Datz C., 2008. Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **135**, 680-688.
4. Al-Tubaikh J.A., 2010. Hemosiderosis and hemochromatosis. *Internal Medicine, An Illustrated Radiological Guide*, 290-292.
5. Aouad F., Florence A., Zhang Y., Collins F., Henry C., Ward R.J., Crichton R.R., 2002. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta* **339**, 470-480.
6. AZA Prosimian Taxon Advisory Group (PTAG) 2003. Iron storage disease in lemurs. Working paper, PTAG meeting on iron storage disease, 29 March, St. Louis Zoo, St. Louis, Missouri.
7. Baird S.K., Kurz T., Brunk T., 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem. J.* **394**, 275-283.
8. Bennett R.N., Wallsgrave R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* **127**, 617-633.
9. Beutler, E., West C., Speir J.A., Wilson I.A., Worley M., 2001. The HFE gene of browsing and grazing rhinoceroses: a possible site of adaptation to a low-iron diet. *Blood Cell Mol. Dis.* **27**, 342-350.
10. Beutler E.C., Hoffbrand A.V., Cook J. D., 2003. Iron deficiency and overload. *Hematology (The American Society of Hematology Education Program)*, 40-61.
11. Bian G., Ma L., Su Y., Zhu W., 2013. The Microbial Community in the Feces of the White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*) as Determined by Barcoded Pyrosequencing Analysis. *PLoS ONE* **8**(7).
12. Bonar C.J., Trupkiewicz J.G., Toddes B., Lewandowski A.H., 2006. Iron storage disease in Tapirs. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **37**, 49-52.
13. Boufennara S., Lopez S., Bousseboua H., Boda R., Bouazza L., 2012. Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands. *Spanish Journal of Agricultural Research* **10**, 88-98.
14. Brewer N.R., 1987. Comparative metabolism of copper. *J Am Vet Med Assoc* **190**, 654-658.
15. Britton R.S., Ramm G.A., Olynyk J., Singh R., O'Neill R., Bacon B.R., 1994. Pathophysiology of iron toxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **356**, 239-253.
16. But P.H., Lung L.C., Tam Y.K., 1990. Ethnopharmacology of rhinoceros horn. I. Antipyretic effects of rhinoceros horn and other animal horns. *Journal of Ethnopharmacology* **30**, 157-168.
17. Candra D., Radcliffe R.W., Andriansyah, Khan M., Tsu I., Paglia D.E., 2012. Browse Diversity And Iron Loading In Captive Sumatran Rhinoceroses (*Dicerorhinus Sumatrensis*): A Comparison Of Sanctuary And Zoological Populations. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **43**, 66-73.
18. Cherukuri S., Potla R., Sarkar J., Nurko S., Harris Z.L., Fox P.L., 2005. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab.* **2**, 309-319.
19. Citino S., Bryant B., Duncan M., Fleming G., Hofmeyr M., Miller E., Miller M., Mylniczenko N., Paglia D., M.D., Radcliffe R., 2012. IOD in Rhinos - Veterinary group report: report from clinical medicine and pathology working group of the international workshop on iron overload disorder in browsing rhinoceros (February 2011). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **43**, 105-107.

20. Clauss M., Lechner-Doll M., Hänichen T., Hatt J.-M., 2002. Excessive iron storage in captive mammalian herbivores - a hypothesis for its evolutionary etiopathology. *Proc Eur Assoc Zoo Wildl Vet* 4, 123-31.
21. Clauss M., 2003. Tannins in the nutrition of wild animals: A review. In: Fidgett, A., M. Clauss, U. Ganslober, J.-M. Hatt, and J. Nijboer (eds.). *Zoo Animal Nutrition*. vol. 2. Filander Verlag, Furth, Germany. Pp. 53–89.
22. Clauss M., Gehrke J., Hatt J.M., Dierenfeld E.S., Flach E., Hermes R., Castell J., Streich W.J., Fickel J., 2005a. Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative biochemistry and Physiology, Part A* 140, 67-72.
23. Clauss M., Polster C., Kienzle E., Wiesner H., Baumgartner K., von Houwald F., Ortmann S., Streich W.J., Dierenfeld E.S., 2005b. Studies on digestive physiology and feed digestibilities in captive Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89, 229-237
24. Clauss M., Hatt J.-M., 2006. The feeding of rhinoceros in captivity. *Int. Zoo Yb.* 40, 197-209.
25. Clauss M., Castell J.C., Kienzle E., Dierenfeld E.S., Flach E.J., Behlert O., Ortmann S., Streich W.J., Hummel J., Hatt J.-M., 2007a. The influence of dietary tannin supplementation on digestive performance in captive black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91, 449-458.
26. Clauss M., Castell J.C., Kienzle E., Schramel P., Dierenfeld E.S., Flach E.J., Behlert O., Streich W.J., Hummel J., Hatt J.-M., 2007b. Mineral absorption in the black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) as compared to the domestic horse. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91, 193-204.
27. Clauss M., Dierenfeld E.S., 2008. The nutrition of "browsers". In: Fowler M.E. et al., Miller R.E.. *Zoo and wild animal medicine: current therapy*. St. Louis, USA, 444-454.
28. Clauss M., Paglia D.E., 2012. Iron storage disorders in captive wild mammals: the comparative evidence. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S6-S18.
29. Clauss M., Dierenfeld E., Goff J., Klasing K., Koutsos L., Lavin S., Livingston S., Nielson B., Schlegel M., Sullivan K., Valdes E., Ward A., 2012. IOD in rhinos - Nutrition group report: report from the nutrition working group of the international workshop on iron overload disorder in browsing rhinoceros (february 2011). Source: *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43, 108-113.
30. Collins H.L., 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol. Lett.* 85, 193-195.
31. Cornelissen H., Ducatelle R., Roels S., 1995. Successful Treatment of a Channel-Billed Toucan (*Ramphastos vitellinus*) with Iron Storage Disease by Chelation Therapy: Sequential Monitoring of the Iron Content of the Liver during the Treatment Period by Quantitative Chemical and Image Analyses. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 9, 131-137.
32. Crawshaw G, Oyarzun S, Valdes E, Rose K. 1995. Hemochromatosis (Iron Storage Disease) in Fruit Bats. In *Proceedings of the First Conference on Zoo and Wildlife Nutrition*, AZA Nutrition Advisory Group, Scarborough, OT.
33. Crosby W.H., 1963. The control of iron balance by intestinal mucosa. *Blood* 22, 441-449.
34. Dearing, M.D., Mangione A.M., Karasov W.H., 2001. Plant secondary compounds as diuretics: an overlooked consequence. *American Zoologist* 41, 890-901.
35. De Domenico I., Ward D.M., di Patti M.C., 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 26, 2823-2831.
36. Dennis P.M, Funk J.A., Rajala-Schultz P.J., Blumer E.S., Miller R.E., Wittum T.E., Saville W.J.A., 2007. A review of some of the health issues of captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 509-517.
37. Dennis P., Ellis S., Mellen J., Lee P., Olea-Popelka F., Petric A.B.S., Ryder O., 2012. IOD in Rhinos - epidemiology group report: report from the epidemiology working group of the international workshop on iron overload disorder in browsing rhinoceros (February 2011). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S114-S116.

38. Dierenfeld E.S., Pini M.T., Sheppard C.D., 1994. Hemosiderosis and Dietary Iron in Birds. American Institute of Nutrition. *J. Nutr.* **124**, 2685-2686.
39. Dierenfeld E.S., du Toit R., Braselton W. E., 1995. Nutrient composition of selected browses consumed by black rhinoceros in the Zambezi Valley, Zimbabwe. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **26**, 220-230.
40. Dierenfeld E.S., Wildman R.E.C., Romo S., 2000. Feed intake, diet utilization, and composition of browses consumed by the Sumatran rhino (*Dicerorhinus sumatrensis*) in a North American zoo. *Zoo Biology* **19**, 169-180.
41. Dierenfeld E.S., Atkinson S., Craig A.M., Walker K.C., Streich W.J., Clauss M., 2005. Mineral concentrations in serum/plasma and liver tissue of captive and free-ranging rhinoceros species. *Zoo Biol.* **24**, 51-72.
42. Eaton J.W., Qian M., 2002. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 833-840.
43. Emslie R., Brooks M., 1999. African rhino status survey and conservation action plan. Gland and Cambridge: IUCN/SSC African Rhino Specialist Group.
44. Emslie R.H., Knight M.H., 2014. Update on African Rhino status and poaching trends from IUCN SSC African Rhino Specialist Group (AfRSG). Report to CITES standing committee 65th meeting pp.1-6.
45. Endo H., Morigaki T., Fujisawa M., Yamagiwa D., Sasaki M., Kimura J., 1999. Morphology of the Intestinal Tract in the White Rhinoceros "*Ceratotherium simum*". *Anat. Histol. Embryol.* **17**, 292-294.
46. Fleming R.E., Ponka P., 2012. Mechanisms of Disease: Iron Overload in Human Disease. *N Engl J Med* **366**, 348-359.
47. Foose T.J., Wiese R.J., 2006. Population management of rhinoceros in captivity. *Int Zoo Yb.* **40**, 174-196.
48. Frutos P., Hervas G., Giraldez F.J., Mantecon A.R., 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2**, 191-202.
49. Ganz T., 2011. Hcpidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**, 4425-4433.
50. Ganz T., Goff J., Klasing K., Nemeth E., Ph.D., Roth T., 2012. Journal of IOD in Rhinos - immunity group report: report from the immunity, genetics and toxicology working group of the international workshop on iron overload disorder in browsing rhinoceros *Zoo and Wildlife Medicine* **43**, S117-S119.
51. Ganz T., Nemeth E., 2012. Iron homeostasis and it's disorders in mice and men: potential lessons for rhinos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **43**, S19-S26.
52. Ghebremeskel K., Williams G., Brett R.A., Burek R., Harbige L.S., 1991. Nutrient composition of plants most favoured by black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) in the wild. *Camp. Biochem. Physiol.* **98**, 529-534.
53. Goddard J., 1968. Food preferences of two black rhino populations. *East African wildlife journal* **6**, 1-18.
54. Goel G., Puniya A.K., Aguilar C.N., Singh K., 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* **92**, 497-503.
55. Groff J.L, Gropper S.S., 2000. Advanced nutrition and human metabolism. 3rd ed. Belmont (Calif.): Wadsworth/Thomson Learning.
56. Groves C.P., Prithiviraj Fernando P., Robovský J., 2010. The Sixth Rhino: A Taxonomic Re-Assessment of the Critically Endangered Northern White Rhinoceros. *PLoS ONE* **5**(4).
57. Gruys E., Toussaint M.J.M, Niewold T.A., Koopmans S.J., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI* **11**, 1045-1056.
58. Hagerman A.E., Robbins C.T., Weerasuriya Y., Wilson T.C., McArthur C., 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management* **45**, 57-62.
59. Hallquist N.A., Klasing K.C., 1994. Serotransferrin, ovotransferrin and metallothionein levels during an immune response in chickens. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **108**, 375-384.
60. Hamilton S., 1999. Rhinoceros nutrition: a comparative approach. BSc Thesis. Department of Animal Science, University of Sydney.
61. Hansen S.L., Spears J.W., 2009. Bioaccessibility of iron from soil is increased by silage fermentation. *J. Dairy Sci.* **92**, 2896-2905.

62. Harley E.H., Matshikiza M., Robson P., Weber B., 2004. Red blood cell metabolism shows major anomalies in Rhinocerotidae and Equidae, suggesting a novel role in general antioxidant metabolism. *International congress series* 1275, 334-340.
63. Hartzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E., 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1785–1790.
64. Helary S.F., Shaw J.A., Brown D., Clauss M., Owen-Smith N, 2012. Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) natural diets: comparing iron levels across seasons and geographical locations. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S48-S54.
65. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C., 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-297.
66. Hofmann R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologica* 78, 443-457.
67. Hume D.A., 2006. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology* 18, 49-53.
68. IUCN species survival commission. IUCN red list categories and criteria, second edition, 2000. 51st meeting of the IUCN council
69. Jarman P.J. 1974. The social organization of antelope in relation to their ecology. *Behaviour* 48, 215-267.
70. Jeffries T.W., 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1, 163-176.
71. Jones D.M., 1979. The husbandry and veterinary care of captive rhinoceroses. *Int Zoo Yearb* 19, 239-52.
72. Kelly J.D., Blyde D.J., Denney I.S., 1995. The importation of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) from Zimbabwe into Australia. *Aust. Vet. J.* 72, 369-374.
73. Kiefer B., Gaslosser U., Kretzschmar P., Kienzle E., 2003. Food selection and food quality in territorial males of a free-ranging population of white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) in South Africa. In: Fidgett, A., Clauss, M., Ganslosser, U., Hatt, J.-M., Nijboer, J. (Eds.), *Zoo Animal Nutrition* 2, 199–207.
74. Klasing K.C., Dierenfeld E.S., Koutsos E.A., 2012. Avian iron storage disease: variations on a common theme? *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, 27-34.
75. Kock N., Foggin C., Kock M.D., Kock R., 1992. Hemosiderosis in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*): A Comparison of Free-Ranging and Recently Captured with Translocated and Captive Animals. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 23, 230-234.
76. Kock, N. D., Kock M.D., Young K.B., 1994. Hepatopathy in two black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) in Zimbabwe: creosote toxicosis? *J. Zoo Wildl. Med.* 25, 270-273.
77. Kontoghiorghes G.J., Weinberg E.D., 1995. Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. *Blood Rev* 9, 33-45.
78. Kumar R., 1991. Anti-nutritional factors: the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. In: Speedy A, Pugliese JL (eds) *Legume trees and other fodder trees as protein sources for livestock*. Proceedings of the FAO expert consultation, MARDI, Kuala Lumpur, Malaysia, 14–18 October 1991 (<http://www.fao.org>.)
79. Langlois M.R., Delanghe J.R., 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry* 42, 1589-1600.
80. Laurie A., 1982. Behavioural ecology of the Greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *J. Zool. Lond.* 196, 307–341.
81. Lavin S.R., 2012. Plant phenolics and their potential role in mitigating iron overload disorder in wild animals. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S74-S82.
82. Liao X., Lu Z., Zhang M., Liu X., Shi B., 2004. Adsorption of Cu(II) from aqueous solutions by tannins immobilized on collagen. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79, 335-342.
83. Mayland H.F., Sneva F.A., 1983. Effect of soil contamination on the mineral-composition of forage fertilized with nitrogen. *J. Range Mgmt.* 36, 286-288.

84. McCord J.M., 1996. Effects of positive iron status at a cellular level. *Nutr. Rev.* 54, 85-88.
85. McDowell L.R., 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition (Second Edition)*.
86. Miles R.R., Roberts R.F., Putnam A.R., Roberts W.L., 2004. Comparison of Serum and Heparinized Plasma Samples for Measurement of Chemistry Analytes. *Clinical Chemistry* 50, 1704-1706.
87. Miller R.E., 1993. Hemolytic anemia in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). In Fowler M.E. et al.: *Zoo and wild animal medicine 3rd edition*, 455-458.
88. Miller R.E., Cambre R.C., de Lahunta A., Brannian R.E., Spraker T.R., Johnson C., Boever W.J., 1990. Encephalomalacia in three black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *J. Zoo Wildl. Med.* 21, 192-199.
89. Miller R.E., 1994. Diseases of black rhinoceroses in captivity. Proceedings on a symposium on "Rhinos as game ranch animals".
90. Miller R.E., Fowler M.E., 2014. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8*. Elsevier Health Sciences.
91. Miller M., Olea-Popelka F., Joubert J., Mathebula N., Zimmerman D., Hausler G., Dreyer C., Hofmeyr M., Buss P., 2012. Serum iron and selected biochemical values in free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) from Africa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S55-S60.
92. Mole S., 1993. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochemical systematics and ecology* 21, 833-846.
93. Munson L., Koehler J.W., Wilkinson J.E., Miller, R.E., 1998. Vesicular and ulcerative dermatopathy resembling superficial necrolytic dermatitis in captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Vet. Path.* 35, 31-42.
94. Mylniczenko N.D., Sullivan K.E., Corcoran M.E., Fleming G.J., Valdes E.V., 2012. Management strategies of iron accumulation in a captive population of black rhinoceroses (*Diceros bicornis minor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S83-S91.
95. Nairz M., Fritsche G., Brunner P., Talasz H., Hantke K., G., 2008. Interferon- γ limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38, 1923-1936.
96. Nemeth, E., Rivera S., Gabayan V., Keller C., Taudorf S., Pedersen B.K., Ganz T., 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 113, 1271-1276.
97. Nemeth E., Ganz T., 2009. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 122, 78-86.
98. Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Sirito M., Sawadogo M., Kahn A., Vaulont S., 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4596-4601.
99. Nielsen B.D., Vick M.M., Dennis P.M., 2012. A potential link between insulin resistance and iron overload disorder in browsing rhinoceroses investigated through the use of an equine model. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, S61-S65.
100. Olias P., Mundhenk L., Bothe M., Ochs A., Gruber A.D., Klopffleisch R., 2012. Iron Overload Syndrome in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*): Microscopical Lesions and Comparison with Other Rhinoceros Species. *Journal of Comparative Pathology* 147, 542-549.
101. Osofsky S.A., Paglia D.E., Radcliffe R.W., Miller R.E., Emslie R.H., Foote T.J., du Toit R., Atkinson M.W., 2001. First, do no harm: a precautionary recommendation regarding the movement of black rhinos from overseas zoos back to Africa. *Pachyderm* 30, 17-23.
102. Owen-Smith R.N., 1998. *Megaherbivores: The Influence of Very Large Body Size on Ecology*. Cambridge university press, p16.
103. Paglia D.E., 1994. Haemolytic anaemia in captive black rhinoceroses: potential strategies for prevention and therapy. Proceedings on a symposium on "Rhinos as game ranch animals"
104. Paglia D.E., Miller R.E., Renner S.W., 1996. Is impairment of oxidant neutralization the common denominator among diverse diseases of black rhinoceroses? *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet. Annu. Meet.* 37-41.

105. Paglia D.E., Dennis P., 1999. Role of chronic iron overload in multiple disorders of captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). Proc. Am. Assoc. Zoo Vet. Annu. Meet. 163-171.
106. Paglia D.E., Dierenfeld E.S., Tsu I.H., 2001a. Pathological iron overloads acquired in captivity by browsing (but not naturally grazing) rhinoceroses. Proc. Intern. Eleph. Rhino. Res. Symposium: a Research Update on Elephants and Rhinos. Vienna, Austria. P. 217.
107. Paglia D.E., Kenny D.E., Dierenfeld E.S., Tsu I.H., 2001b. Role of excessive maternal iron in the pathogenesis of congenital leukoencephalomalacia in captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). Am. J. Vet. Res. 62, 343-349.
108. Paglia D.E., Tsu I., 2012. Review of laboratory and necropsy evidence for iron storage disease acquired by browser rhinoceroses. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 43, S92-S104.
109. Parker D.M., Bernard R.T.F., Fike B., 2009. Consumption of grass by black rhinoceroses in the Thicket Biome. African Journal of Ecology 47, 454-456.
110. Prieto J., Barry M., Sherlock S., 1975. Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver diseases. Gastroenterology 68, 525-33.
111. Rossi E., 2005. Hepcidin - the Iron Regulatory Hormone. Clin Biochem Rev Vol 26, 47-49.
112. Schmidt R.E., Toft II J.D., Eason R.L., Hartfiel D.A., 1982. Possible Toxic Liver Degeneration in Black Rhinoceroses (*Diceros bicornis* Source: The Journal of Zoo Animal Medicine 13, 3-10.
113. Shipley L.A., 1999. Grazers and browsers: how digestive morphology affects diet selection. Grazing behavior of livestock and wildlife 70, 20-27.
114. Smith J.E., Chavey P.S., Miller R.E., 1995. Iron metabolism in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. J. Zoo Wildl. Med. 26, 525-531.
115. Smith A.H., Zoetendal E., Mackie R.I., 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. Microbial ecology 50, 197-205.
116. Steuer P., Clauss M., Südekum K.-H., Hatt J.-M., Silinski S., Klomburg S., Zimmermann W., Fickel J, W.J. Streich W.J., Hummel J., 2010 Comparative investigations on digestion in grazing (*Ceratotherium simum*) and browsing (*Diceros bicornis*) rhinoceroses. Comparative Biochemistry and Physiology 156, 380-388.
117. Sullivan K.E., Valdes E.V., Livingston S.E., Knutson M.D., Staples C.R., Warren L.K., Lavin S.R., 2015. Use of a novel iron chelator (HBED) in black rhinoceros. In Bissell H, Brooks M Eds. Proceedings of the Eleventh Conference on Zoo and Wildlife Nutrition, AZA Nutrition Advisory Group, Portland, OR.
118. Tuntawiroon M., Sritongkul N., Brune M., Rossander-Hulten L., Pleehachinda R., Suwanik R., Hallberg L., 1991. Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. American Journal of Clinical Nutrition 53, 554-557.
119. Vahala J. 1990. Brief analysis of veterinary care of black rhinoceros (*Diceros bicornis*) at Dvur Kralove zoo. Verh Ber Erkr Zootiere 32, 261-75.
120. Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.P., 1874. The involvement of lactoferrin in the hypsideremia of acute inflammation. J. exp. Med. 140, 1068-1084.
121. Vigne R., 2015. Nola the northern white rhino's death leaves just three in the world. Internetreferentie <http://www.olpejetaconservancy.org/and-then-there-were-three/> (Geconsulteerd op 2 maart 2016)
122. Vossen J.P.H.M., Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium, Utrecht.
123. Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T. L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G. J., 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the mouse. Nat. Genet. 21, 195-199.
124. Waldram M.S., Bond W.J., Stock W.D., 2008. Ecological Engineering by a Mega-Grazer: White Rhino Impacts on a South African Savanna. Ecosystems 11, 101-112.
125. Ward A.M., Hunt A.S., 2001. Summary of mineral and iron binding polyphenolic plant compound levels in diets offered captive black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in 3 zoos and 1 ranch in Texas. Proceedings of

- the 4th Nutrition Advisory Group Conference on Zoo and Wildlife Nutrition, Bay Lake, Florida. Pp. 173–186.
126. Ward A.M., Slifka K., 2011. Dietary iron absorption and the role of tannins in black rhinoceros. International Workshop on Iron Storage Disease in Black Rhinoceros. Orlando, Florida.
127. Weinberg E.D., 1990. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev* 22, 531-579.
128. Weiss G., 2005. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 18, 183-201.
129. Welch K. D., Hall J. O., Davis T. Z., Aust S. D., 2007. The effect of copper deficiency on the formation of hemosiderin in Sprague-Dawley rats. *Biometals* 20, 829–839.
130. Wessling-Resnick M., 2010. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu. Rev. Nutr.* 30, 105-122.
131. Xiao X., Liu J., Luo B., Feng X., Su Y., 2011. Relationship of dietary iron intake, body iron overload and the risk of metabolic syndrome. *Wei Sheng Yan Jiu.* 40, 32-35.
132. Zheng Y., Danilenko D.M., Valdez P., Kasman I., Eastham-Anderson J., Wu J., Ouyang W., 2006. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648-651.