

GEASSISTEERDE VOORTPLANTING BIJ DE  
WITTE (*CERATOTHERIUM SIMUM*) EN  
ZWARTE (*DICEROS BICORNIS*) NEUSHOORN  
OM DE SOORTEN TE HELPEN IN HUN HUIDIGE  
BEDREIGDE SITUATIE

Aantal woorden: < 13848 >

**Sofie Geerinck**

Studentennummer: 01202151

Promotor: Prof. dr. An Martel

Promotor: Prof. dr. Peter Daels

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2018 – 2019

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

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

## VOORWOORD

---

In dit voorwoord hou ik eraan iedereen te bedanken die mij geholpen heeft om deze masterproef tot een goed einde te brengen en meer algemeen mij door deze lange studie te helpen. Eerst en vooral wil ik de professoren P. Daels en A. Martel bedanken voor de verbeteringen. Professor P. Daels wil ik in het bijzonder bedanken om mij bij te staan met zijn goede raadgevingen. Mijn mama en papa wil ik bedanken voor de vele verbeteringen en hun geduld tijdens deze soms stresserende periode. Mijn zus Lynn heeft tijdens heel mijn studie gezorgd voor de tijdige ontspanning en de morele steun. Als laatste wil ik mijn Meme bedanken om altijd achter mij te staan en in mij te geloven.

Sofie GEERINCK  
Mei 2019

# INHOUDSTABEL

---

|  |    |
|--|----|
| VOORWOORD  |    |
| INHOUDSTABEL   |    |
| SAMENVATTING .....   | 1  |
| SITUERING .....  | 2  |
| INLEIDING .....  | 4  |
| ANATOMIE VAN HET VOORTPLANGINGSSTELSEL .....   | 6  |
| 1. DE VROUWELIJKE NEUSHOORN .....  | 6  |
| 2. DE MANNELIJKE NEUSHOORN .....   | 8  |
| SPERMA-AFNAME EN SPERMA -BEWARING .....  | 10 |
| 1. SPERMA -AFNAME .....  | 10 |
| 2. SPERMA -BEWARING .....  | 15 |
| 2.1 <i>Afkoelprocedure</i> .....   | 17 |
| 2.2 <i>Invriesprocedure</i> .....  | 17 |
| OESTRUSCYCLUS EN MONITORING .....  | 19 |
| 1. DE NORMALE OESTRUSCYCLUS .....  | 19 |
| 1.1. <i>De witte neushoorn</i> .....   | 19 |
| 1.2. <i>De zwarte neushoorn</i> .....  | 20 |
| 2. MONITORING VAN DE OESTRUSCYCLUS .....   | 21 |
| OESTRUS EN OVULATIE-INDUCTIE .....   | 24 |
| KUNSTMATIGE INSEMINATIE (KI) .....   | 25 |
| IN VITRO FERTILISATIE (IVF) EN INTROCYTOPLASMATISCHE SPERMA-INJECTIE (ICSI) .....    | 28 |
| 1. OVARIËLE SUPERSTIMULATIE .....  | 28 |
| 2. OVUM PICK-UP (OPU) .....  | 28 |
| 3. IN VITRO FERTILISATIE (IVF) EN INTRACYTOPLASMATISCHE SPERMA INJECTIE (ICSI) ..... | 29 |
| 4. EMBRYOTRANSFER .....  | 30 |
| 5. EMBRYO CRYOPERSERVATIE: .....   | 31 |
| ANDERE TECHNIEKEN .....  | 32 |
| DISCUSSIE .....  | 33 |
| REFERENTIELIJST: .....   | 36 |
| BIJLAGE .....  | 39 |

## SAMENVATTING

---

Deze masterproef handelt over geassisteerde voortplantingstechnieken bij de witte en zwarte neushoorn. Dit onderwerp is momenteel zeer actueel door de dalende populatie aan zwarte en witte neushoorns omwille van de toename van stroperij en het verlies van habitat. Recent is deze problematiek opnieuw in de actualiteit verschenen door het overlijden van Sudan (de laatste mannelijke noordelijke witte neushoorn) op 19 maart 2018.

In deze masterproef zal ingegaan worden op welke manier we deze soorten kunnen bijstaan met behulp van geassisteerde voortplantingstechnieken.

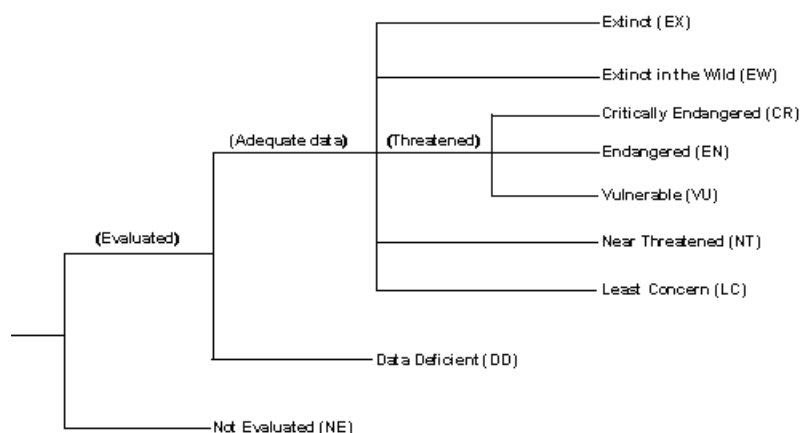
Er wordt een overzicht gegeven van de technieken die al succesvol toegepast zijn en hoe deze werden verfijnd over de jaren heen. Sommige van deze technieken staan nog maar in een experimentele fase en kunnen in de nabije toekomst nog niet praktisch toegepast worden. Andere technieken zijn nog nooit toegepast op de neushoorn. In dit geval kan men enkel kijken naar andere diersoorten en nagaan welke de problemen kunnen zijn bij het toepassen van deze technieken op neushoorns.

Uit de studie van de bestaande technieken en hun succes kon men besluiten dat sperma-afname en spermabewaring de meest succesvolle zijn. Voor de andere technieken is er nog veel verbetering te realiseren en moet er nog meer onderzoek gebeuren om tot een uiteindelijk besluit omtrent de toepasbaarheid en het potentieel op succes te komen. Er is nog veel werk te realiseren rond dit onderwerp. Het positieve is dat er veel experts werken aan een oplossing om deze soorten te kunnen helpen.

Trefwoorden: Geassisteerde voortplanting – Neushoorn - Wildlife conservation

## SITUERING

De huidige situatie van de witte en zwarte neushoorn is zeer slecht. Bijna alle ondersoorten van deze species zijn met uitsterven bedreigd, bijna uitgestorven of al uitgestorven. Als we alleen al naar de situatie gaan kijken van de Noordelijke witte neushoorn (*C.s. cottoni*) ziet men hoe slecht het gaat. Van deze ondersoort blijven momenteel (dd. juni 2019) nog maar 2 vrouwelijke exemplaren over na het overlijden van het laatste mannelijke dier "Sudan" op 19 Maart 2018. Men kan stellen dat deze ondersoort zo goed als zeker zal uitsterven. Van de andere ondersoort zijn er wel nog meer levende dieren en is het nog niet te laat. Een combinatie van anti -stroperij campagnes, conservatie van hun habitat en geassisteerde voortplanting zouden hier nog een oplossing kunnen bieden (Amin et al., 2006). De huidige situatie wordt geïllustreerd in tabel 1. Deze tabel hanteert het classificatiesysteem van het IUCN (International Union for Conservation of Nature) zoals te zien is in figuur 1.



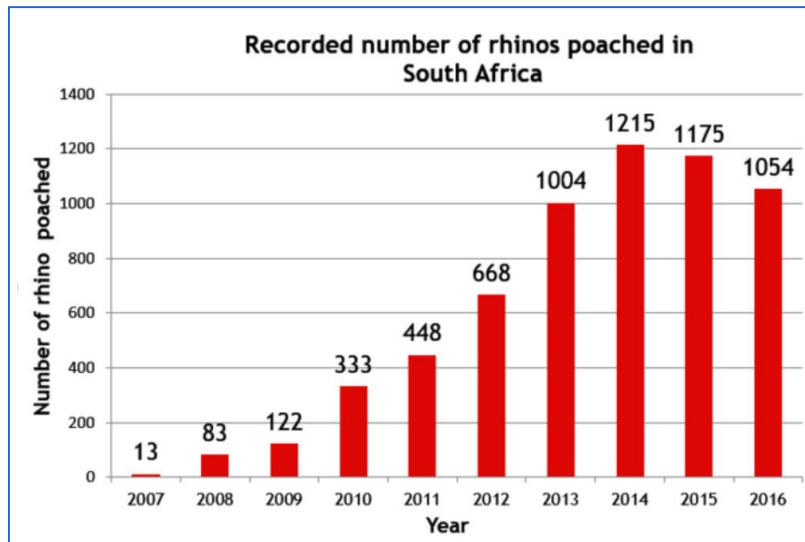
Figuur 1.: Het classificatiesysteem van het IUCN.

| Species   | Subspecies   | Classificatie              | Huidige populatietrend |
|---|--|----------------------------|------------------------|
| Witte neushoorn<br>( <i>Ceratotherium simum</i> ) | Noordelijke witte neushoorn ( <i>C.s. cottoni</i> )        | Critically endangered (CR) | Daling                 |
|   | Zuidelijke witte neushoorn ( <i>C.s. simum</i> )           | Near treatedened (NT)      | Stijging               |
| Zwarte neushoorn<br>( <i>Diceros bicornis</i> )   | Zuid –westelijke zwarte neushoorn ( <i>D.b. bicornis</i> ) | Vulnerable (VU)            | Stijging               |
|   | Westelijk zwarte neushoorn ( <i>D.b. longipes</i> )        | Extinct (EX) sinds 2006    | /                      |
|   | Oostelijke zwarte neushoorn ( <i>D.b. michaeli</i> )       | Critically endangered (CR) | Stijging               |
|   | Zuidelijk –centrale zwarte neushoorn ( <i>D.b. minor</i> ) | Critically endangered (CR) | Stijging               |

Tabel 1: Deze tabel geeft de classificatie weer van de subspecies van de zwarte en witte neushoorn volgens de gegevens van het IUCN.

In tabel 1 is te zien hoe elke ondersoort van de witte en zwarte neushoorn een classificatie heeft gekregen die weergeeft hoe het gaat met deze soort. Ook geeft het IUCN weer dat de huidige populatietrend in stijgende of dalende lijn gaat. Deze gegevens geven weer dat zowel de zwarte als

witte neushoorn in gevaar zijn om binnen afzienbare tijd uit te sterven en een van deze ondersoorten van de zwarte neushoorn is zelfs al uitgestorven. De Zuidelijke witte neushoorn is momenteel niet bedreigd maar ongeveer 93% van deze neushoorns zijn gelokaliseerd in Zuid –Afrika waar per jaar iets meer dan 1000 neushoorns (witte en zwarte neushoorns) worden gedood door stroperij (zie grafiek 1). Als deze stroperij blijft aanhouden kan deze ondersoort snel evolueren naar de status “bedreigd”. Het is zeer waarschijnlijk dat stroperij de komende jaren niet onmiddellijk zal verminderen aangezien men te maken heeft met een georganiseerde criminaliteit die goed gefinancierd en goed uitgerust wordt. Het verlies van ongeveer 1000 neushoorns per jaar aan stroperij in Zuid –Afrika is niet de enige bedreiging van de neushoorns. Ook verlies van habitat en fragmentatie bedreigen hun voortbestaan (Mettrione et al., 2010).



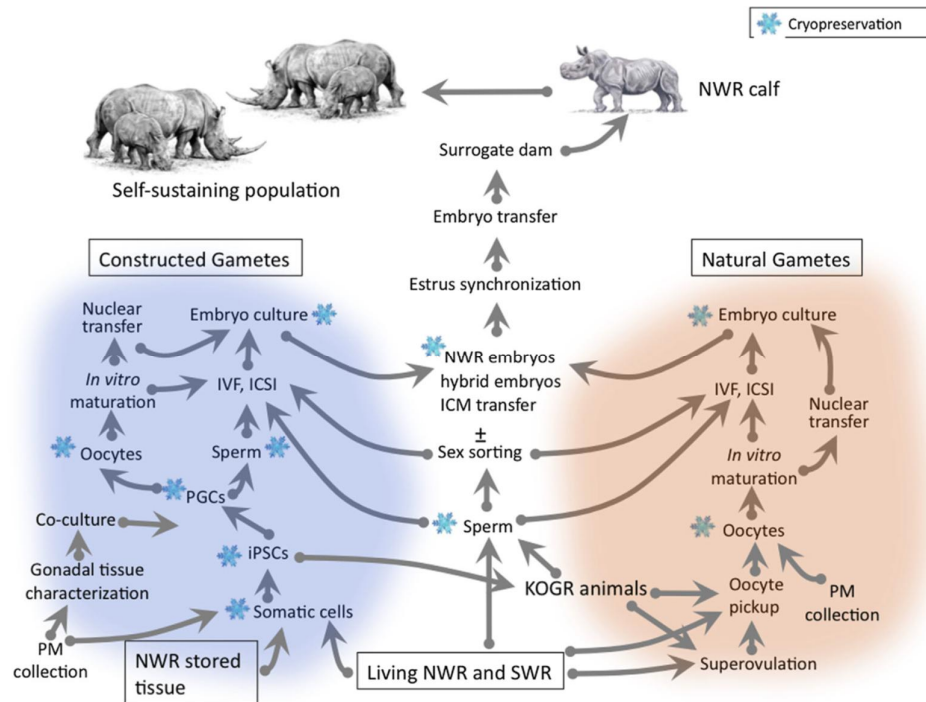
Grafiek 1: Statistiek van de stroperij op neushoorns in Zuid-Afrika vrijgegeven in Februari 2017 door het Department for Environmental Affairs.

Als men gaat kijken naar een rapport van de “robin des bois” organisatie van het “on the trail” programma gaande van 1 Juli 2018 tot 30 September 2018 ziet men hoe de huidige situatie is. In deze periode werden in Zuid -Afrika alleen 13 neushoorns gedood door stropers en nog eens 26 werden gedood in illegale “game hunting”. In de rest van Afrika werden 12 neushoorns gedood door stropers en kwam nog 1 kalf om door verhongering na de dood van zijn moeder (gedood door stropers). In Kenia stierven 11 neushoorns bij relocatie door transport, te zout drinkwater in de nieuwe locatie of door een roofdier aanval. In Afrika stierven in 3 maanden tijd 63 neushoorns voornamelijk veroorzaakt door menselijke interactie. Dit zijn enkel de neushoorns waar men de kadavers van heeft gevonden, het werkelijke aantal ligt vermoedelijk veel hoger. Bovendien was in dit rapport nog te lezen over vermeden stroperij, arrestaties van stropers en de moord op 2 “rangers” door stropers.

Wegens bovenstaande redenen is het belangrijk om te kijken naar manieren om de zwarte en witte neushoorns te assisteren met voortplanting. Op deze manier zouden verschillende ondersoorten van de Afrikaanse neushoorn nog kunnen gered worden van uitsterven.

## INLEIDING

In deze masterproef zullen er meerdere geassisteerde voortplantingstechnieken besproken worden die de witte en zwarte neushoorns kunnen helpen om voort te bestaan. Sommige technieken zijn al verscheidene keren toegepast, andere staan nog maar in de beginfase. In de discussie wordt een beschouwing gegeven van hoe deze technieken de bijna uitgestorven noordelijke witte neushoorn zouden kunnen behoeden van uitsterven. Hiervoor gebruik ik het onderzoek van Saragusty et al. (2016) als leidraad, zie figuur 2.



Figuur 2. Een overzicht van de verschillende technieken die de noordelijke witte neushoorn zouden kunnen behoeden van uitsterven (Saragusty et al., 2016).

Eerst zal de normale anatomie van de vrouwelijke en mannelijke neushoorns kort besproken worden. Dit is belangrijk om de problemen te begrijpen die bestaan bij toepassing van sommige geassisteerde voortplantingstechnieken.

Een hoofdstuk wordt gewijd aan alles omtrent sperma-afname en spermbewaring. Hier zal nagegaan worden wat de effecten zijn op de spermakwaliteit. De spermakwaliteit is immers zeer belangrijk om de kans op succes bij kunstmatige inseminatie (KI) en in-vitrofertilisatie (IVF) te optimaliseren. Ingevroren sperma wordt vergeleken met gekoeld sperma. Ook het afkoel- en invriesproces komt hierbij aan de orde. Ook de invloed van bepaalde verdunners en cryoprotectants op de spermakwaliteit is onderwerp van bespreking.

Na de geassisteerde voortplantingstechnieken van het mannelijk dier zal dat van de vrouwelijke witte neushoorn besproken worden. De oestruscyclus van beide soorten komen aan de orde en ook hoe men de oestruscyclus kan monitoren. Dit is belangrijk in het kader van de bespreking van hormonale beïnvloeding van de oestruscyclus.



Een volgend punt dat aan bod komt is kunstmatige inseminatie (KI) waarbij ingegaan wordt op de technieken - en het succes dat hier al mee bekomen is – die gebruik maken van zowel diepgevroren als gekoeld sperma.

Verder is er In-vitrofertilisatie (IVF) en intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI). Deze technieken staan nog in een beginfase en zijn nog maar enkele malen uitgevoerd. De recentere successen met deze technieken zullen aan het bod komen. Ook wordt er nog kort ingegaan op andere technieken zoals klonen die nog nooit zijn toegepast maar die belangrijk zijn om de noordelijke witte neushoorn te kunnen helpen.

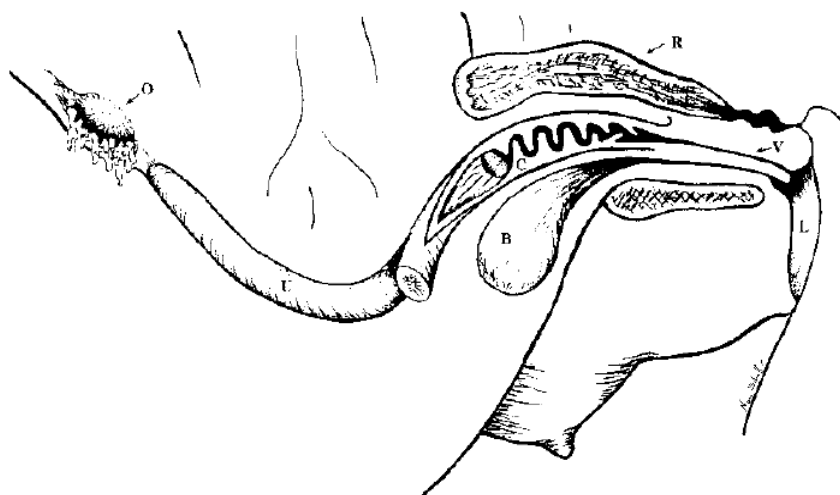
Tot slot wordt er een conclusie getrokken vertrekkende van alle besproken onderwerpen. Er zal bekeken worden hoe deze technieken het voortbestaan van de species kunnen helpen. Als voorbeeld worden de mogelijkheden om de noordelijke witte neushoorns te redden van uitsterven behandeld. Deze ondersoort van de witte neushoorn telt momenteel nog maar 2 individuen (Najin, een vrouwelijk dier en Fatu, de dochter van Najin). Deze overgebleven dieren zijn infertiel en niet meer in staat tot natuurlijke dekking. Ook kunstmatige inseminatie biedt geen oplossing. Er zijn wel nog spermastalen en celmateriaal beschikbaar van deze soort (zie bijlage 1). Ik ga in op wat hiermee de opties zijn en welke technieken wel toepasbaar zouden kunnen zijn voor het behoud van deze ondersoort. De vraag welke lessen we kunnen leren uit het bijna uitsterven van deze soort en hoe we dit kunnen voorkomen bij de andere soorten zal beantwoord worden.

# ANATOMIE VAN HET VOORTPLANTINGSTELSEL

## 1. DE VROUWELIJKE NEUSHOORN

Zoals reeds in de inleiding is vermeld is de anatomie bespreken belangrijk om de verschillende geassisteerde voortplantingstechnieken beter te begrijpen. Het is belangrijk te weten wat de obstakels kunnen zijn bij de toepassing van technieken als KI, ovum pick up (OPU) en embryotransfer.

De neushoorn beschikt over een bicornuate uterus. Het vrouwelijke geslachtsstelsel van de neushoorn heeft een relatief lange uteriene hoorn in vergelijking met de totale lengte van het vrouwelijk geslachtsstelsel. Het uterus lichaam is dan weer relatief klein. Deze conformatie is verschillend van deze van de merrie en is eerder vergelijkbaar met deze van de teef of de zeug (Godfrey et al., 1991).



Figuur 3: De abdominale oriëntatie van het voortplantingsstelsel bij de vrouwelijke Afrikaanse neushoorn. O= ovaria; U= uterushoorn; C= Cervix; V= vagina; L= vulva; B= urineblaas; R=rectum. (Schaffer et al., 2001)

De uterus en de ovaria zijn gelegen in het lumbale gebied en hangen losjes vast aan het uteriene ligament. Dit uteriene ligament is verbonden aan de dorsale wand van de abdominale wand en is lateraal en caudaal gelegen van de nieren (Schaffer et al., 2001).

De ovaria bevinden zich net craniaal van de uterus en volgens het onderzoek van schaffer et al. (2001) op een afstand van  $14,8 \pm 4,3$  cm van de caudale nierrand bij een nullipare neushoorn en op een afstand van 35 cm bij een multipare (zwarte) neushoorn. De ovaria kunnen ook in nauw contact staan met het colon. De ovaria liggen in de ovariële bursa, welke een serosale invaginatie van het mediale deel van het uteriene ligament is (Schaffer et al., 2001).

Volgens het onderzoek van Schaffer et al. (2001) hebben de ovaria een platte, ovale vorm wanneer deze inactief zijn en een ronde vorm wanneer deze follikels, corpora lutea of cyste hebben.

Bij de vrouwelijke witte neushoorn zou het volume van de actieve ovaria  $29,2 \pm 2,2$  cm<sup>3</sup> bedragen en  $14,7 \pm 1,3$  cm<sup>3</sup> bij de inactieve ovaria. De actieve ovaria zouden 4 tot 10 follikels hebben met een

grootte van meer dan 10 mm. De inactieve ovaria hebben geen follikels of 1 tot 2 follikels met een grootte kleiner dan 4 mm (Hermes et al., 2006).

De zwarte vrouwelijke neushoorns hebben grotere ovaria vergeleken met de witte neushoorns. Het volume van de ovaria zou  $96,5 \pm 59 \text{ cm}^3$  bedragen. Deze data komen uit een onderzoek van Schaffer et al. (2001) gebaseerd op een onderzoek van 10 zwarte neushoorns.

De neushoorns beschikken niet over een ovulatie fossa zoals bij de merrie. In tegenstelling tot de merrie kunnen neushoorns op verschillende plaatsen ovuleren op het hele oppervlak van de ovaria (Godfrey et al., 1991).

De eileiders zijn dunne, kronkelende buisjes die eindigen in de omvangrijke fimbriae (Godfrey et al., 1991). De eileiders zijn gelegen in de ovariële bursa op het latero-ventrale oppervlak (Schaffer et al., 2001).

De uterus bestaat, zoals hogervermeld, uit een kort uterinen lichaam en lange uteriene hoorns dit zowel bij zwarte neushoorn als de witte neushoorn. De diameter van de uteriene hoorns bedraagt bij de zwarte neushoorn  $2 \pm 0,4 \text{ cm}$  en bij de witte neushoorn  $4 \pm 1,0 \text{ cm}$ . Ter hoogte van de bifurcatie bevindt zich een intercornuaal ligament, dit ligament is niet palpeerbaar op rectaal onderzoek (Schaffer et al., 2001).

Het endometrium van zowel de zwarte als witte neushoorn bestaat uit dunne longitudinale plooien die ongeveer 0,5 tot 2 cm uitpuilen in het lumen. Dit is vergelijkbaar met de situatie van de merrie (Schaffer et al., 2001).

De cervix van de neushoorn bestaat uit excentrische ringen, dit wordt ook gezien bij *Bovidae* en *Ovidae*. De cervix bestaat uit dikke fibreuze circulaire en semi circulaire plooien die in het midden van de cervix interdigiteren met elkaar zoals gezien op figuur 4 (Godfrey et al., 1991; Schaffer et al. 2001). Het sterk kronkelend aspect en het afsluiten van de cervix, ter hoogte van het midden van de cervix, zorgen voor moeilijkheden bij het inbrengen van een katheter. Dit kan voor moeilijkheden zorgen bij technieken zoals kunstmatige inseminatie, OPU en embryo-transplantatie.



Figuur 4: Tekening van het voortplantingsstelsel van de vrouwelijke Afrikaanse neushoorn, illustreert de morfologie van de ovaria en de uterus. O=Ovaria; U= Uterushoorn; C= Cervix; V= Vagina; L= Vulva. (Schaffer et al., 2001)

De vagina van de neushoorn bestaat caudaal uit longitudinale plooien die dwars worden in het craniaal gedeelte van de vagina (zie figuur 4). De plooien van de vagina zijn dun en scherp afgelijnd. Dit is verschillend van de plooivorming in de cervix.

De vulvalippen van een neushoorns zijn langer aan de ventrale zijde dan aan de dorsale. De clitoris bevindt zich ventraal in de fossa van de ventrale commissuur (Schaffer et al. 2001).

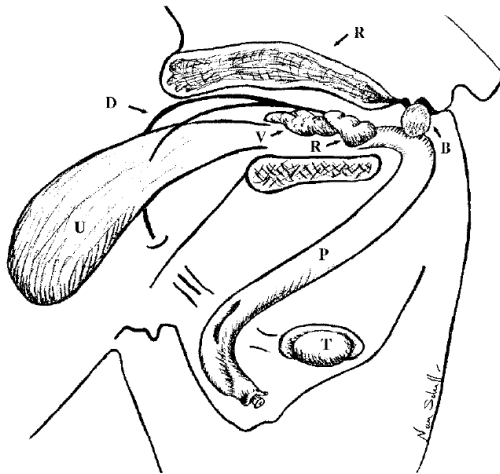
Voor de urethrale opening is er een hymen aanwezig, al dan niet intact. Dit hymen verhindert de ingang in de vagina. Het al dan niet aanwezig zijn van een intact hymen kan ons meer informatie geven over de reproductiestatus van een neushoorn (Schaffer et al., 2001). Wanneer het hymen nog volledig intact is kan men besluiten dat er nog geen succesvolle paring heeft plaatsgevonden (Hermes et al., 2006).

## 2. DE MANNELIJKE NEUSHOORN

De anatomie van het voortplantingsstelsel van de mannelijke witte neushoorn wordt hier kort besproken, dit om de sperma-afname beter te kunnen vatten.

Het voortplantingsstelsel van de zwarte en witte neushoorn zijn gelijkaardig. De penis van de neushoorn is van het musculocaverneuze type. In rust heeft deze een buiging zodat de tip naar caudaal is gericht. Deze is op dat moment volledig bedekt met het preputium. In erectie verdwijnt deze buiging en zal de penis naar craniaal richten (zie figuur 5). De penis van de neushoorn heeft ook iets bijzonders dat enkel wordt gezien bij de neushoorn en de tapir. Dit zijn de laterale peniele flaps die zo'n 20 – 25 cm lang zijn. Deze zorgen bij erectie voor een significante verbreding van de diameter. De glanspenis heeft een paddenstoelvorm. Uit al deze kenmerken kan men besluiten dat de neushoorn waarschijnlijk een cervixbezaaier is (Schaffer et al., 2001; Hermes en Hildebrandt, 2011).

De testikels bevinden zich dorsolateraal van de penis met een verticaal tot meer horizontale positie, dit is zichtbaar op figuur 5. Dit zorgt voor een slechte palpeerbaarheid van de testikels. De testikels zijn bedekt met een dikke huid en dens kapsel. Dit alles maakt het onmogelijk om de testikels te palperen met het oog op het bepalen van de functionaliteit of ontdekken van pathologische letsels (Hermes en Hildebrandt, 2011).



Figuur 5: Overzicht van het mannelijke voortplantingsstelsel. P=penis; T= testikels; B= bulbourethrale klier; R=prostaat; V=zaadblaasje; U=urineblaas; D=ductus deferens. (schaffer et al.,2001)

De secundaire geslachtsklieren liggen dichtbij de blaashals en zijn rectaal bereikbaar (zie figuur 5). Het zaadblaasje heeft dezelfde vorm als bij de stier. De prostaat bestaat uit twee driehoekige lobben zoals men ook ziet bij de hengst. De bulbourethrale klier bestaat uit twee ronde structuren die dorsolateraal van de urethra liggen. De prostaat en bulbourethrale klieren zijn rectaal voelbaar zo'n 10 tot 15 cm proximaal van de anus sfincter (Schaffer et al., 1990 en 2001).

## SPERMA-AFNAME EN SPERMA -BEWARING

---

Als men gaat kijken naar geassisteerde voortplantingstechnieken is het belangrijk om het mannelijk dier hierbij te betrekken. Voor technieken als KI, IVF en ICSI is het zeer belangrijk dat er op een degelijke manier sperma-afname kan gebeuren zodat de spermacentratie hoog genoeg is. Uit onderzoek bleek dat niet alle sperma-afname technieken hieraan voldoen. Bij spermabewaring is het belangrijk om te kijken wat de invloed is van invriezen op de kwaliteit van het sperma. Momenteel worden veel spermastalen ingevroren met het oog op de ontwikkeling van nieuwe technieken in de toekomst.

### 1. SPERMA –AFNAME

Voor sperma-afname zijn er verscheidene technieken beschikbaar. Elektro-ejaculatie en manuele massage zijn de meest gebruikte. Ik wil bekijken aan de hand van de huidige beschikbare literatuur welke van beide technieken het best toepasbaar zijn en welke de beste spermakwaliteit voortbrengt. Er wordt ingegaan op elektro-ejaculatie en het gebruik van een speciaal ontworpen probe, welke deze techniek verbeterd heeft. Ook de post-mortem verzameling van sperma komt aan bod. Dit is erg belangrijk met het oog op het verzamelen van zo veel mogelijk genetisch materiaal.

In een reviewstudie van Hermes et al. (2001), waar men voorafgaande studies van sperma-afname bij 10 mannelijke witte neushoorns met elkaar vergelijkt, werd de spermakwaliteit onderling vergeleken in functie van twee verschillende sperma-afname technieken. Bij 2 mannelijke witte neushoorns werd er manuele massage als techniek gebruikt. Bij de overige 8 mannelijke witte neushoorns werd er elektro-ejaculatie toegepast. In een ander onderzoek van Schaffer et al. (1998) werden deze technieken ook met elkaar vergeleken. In het onderzoek van Schaffer et al. (1998) werd de methode vergeleken door het gebruik van rectale echografie en werd de elektro-ejaculatie op 2 zwarte neushoorns toegepast en de manuele massage op 1 witte, 1 zwarte en 2 Aziatische neushoorns. De resultaten van de reviewstudie van Hermes et al. (2001) en het onderzoek van Schaffer et al. (1998) zijn zichtbaar in tabel 2.

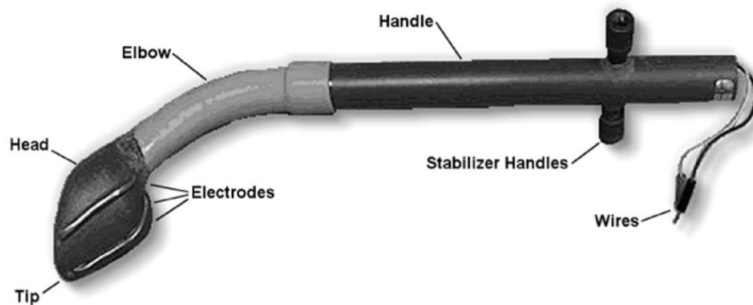
|   | Volume ejaculaat (ml) | Sperma concentratie (10 <sup>6</sup> /ml) | Macroscopisch uitzicht  | Motiliteit (%)   |
|---|-----------------------|---|---|--|
| <b>Manuele massage</b>                                  |                       |   |   |  |
| Hermes et al. (2001)<br>2 witte neushoorns              | 1 – 2                 | 217,3                                     | Helder met witte wormachtige filamenten (spermatozoön aggregaten) | Filamenten: 10 - 30 %<br>Rest sperma: 70 – 80 %<br>Ontdooide spermastalen: 10% |
| Schaffer et al. (1998)<br>1 witte en 1 zwarte neushoorn | 0,7 - 62,2            | 10,0 - 15,0                               | /   | /  |
| <b>Elektro -ejaculatie</b>                              |                       |   |   |  |
| Hermes et al. (2001)<br>8 witte neushoorns              | 124 ± 21,1            | 48,11 ± 12,6                              | Witte uniforme kleur zonder filamenten                            | 70 – 80 %<br>Ontdooide spermastalen: 30%-50%                                   |
| Schaffer et al. (1998)<br>2 zwarte neushoorns           | 15-20                 | 1,0 - 200                                 | /   | /  |

Tabel 2. Vergelijking van de spermakwaliteit tussen manuele massage en elektro-ejaculatie gebaseerd op de onderzoeken van Hermes et al. (2001) en Schaffer et al. (1998).

Zoals blijkt uit tabel 2 is de kwaliteit van het sperma minder goed bij de manuele massage techniek, zeker als het ontdooide stalen betreft. Het volume bij manuele massage is veel kleiner in vergelijking met elektro-ejaculatie. De concentratie aan sperma is lager bij de manuele massage en de kwaliteit is minder goed zoals te zien is in de gegevens van Hermes et al. (2001). Waarschijnlijk is bij elektro-ejaculatie het volume ongeveer gelijk als bij natuurlijke dekking (Hermes en Hildebrandt, 2011). In de studie van Schaffer et al. (1998) is de elektro-ejaculatie nog niet volledig op punt en zijn de resultaten van de elektro-ejaculatie niet zo overtuigend als in het onderzoek van Hermes et al. (2001) waar een speciale probe gebruikt werd die de prostaat beter stimuleert. De manuele massage techniek vergt bovendien tot 12 maanden training en men verkrijgt lagere spermakwaliteit. Het nadeel bij elektro-ejaculatie is dan weer dat er volledige anesthesie moet uitgevoerd worden. Daartegenover is de spermakwaliteit veel hoger. Om deze reden zal ik hier enkel de elektro-ejaculatie bespreken daarbij ondersteund door verschillende artikels die aangeven dat dit de beste methode blijkt te zijn voor een goede spermakwaliteit (Schaffer et al., 1990; Roth et al. 2005).

Doordat de secundaire geslachtsklieren bij de neushoorn zeer caudaal liggen op de blaashals en net achter en onder de anus sfincter (zie figuur 5) is er nood aan een speciale probe om de prostaat te kunnen bereiken tijdens elektro-ejaculatie. Een studie uit 2005 van Roth et al. gebruikte een speciaal ontworpen rectale probe die aangepast werd aan de anatomie van het mannelijk geslachtsstelsel. Normaal zijn deze rectale probes recht met longitudinale elektrodes. Met een longitudinale probe kan men de prostaat niet goed stimuleren en daarom is elektrostimulatie met een rechte rectale probe niet zo effectief. Men heeft daarom een rectale probe ontwikkeld met een ellipsvormig hoofd

naar beneden gebogen zodat de secundaire geslachtsklieren beter konden worden bereikt en gestimuleerd. De rectale probe ziet u op figuur 6.



Figuur 6. De rectale probe ontworpen voor elektro –ejaculatie bij de neushoorn (Roth et al. 2005).

In de studie van Roth et al. (2005) werd deze elektro-ejaculatienuwkeurig beschreven. De dieren werden voor de procedure onder volledige anesthesie gebracht en kregen gedurende de procedure zuurstof (100 %) toegediend. Beide achterbenen werden stevig vastgebonden aan de hekken van het hok zoals ook zichtbaar is in figuur 7. De faeces werden uit het rectum verwijderd en de penis werd gewassen met water. Nadien werd het hoofd van de probe bedekt met glijmiddel en ingebracht net craniaal van de anus sfincter. Nadien werd de probe door middel van de hendel naar boven gebracht zodat het hoofd (met de elektrodes) van de probe caudaal tegen de secundaire geslachtsklieren komt te zitten. Er werden 3 tot 5 series van elektrostimulatie uitgevoerd, elke serie bestaande uit 30 stimulaties. Bij elke nieuwe serie werd het voltage verhoogd (+1V). Tijdens de stimulatie werd de top van de penis in een collectiepot gehouden. Deze collectiepot werd regelmatig vervangen om contaminatie van sperma van goede kwaliteit met sperma van slechte kwaliteit te vermijden. Ook werd de penis regelmatig manueel gemasseerd. Dit verbeterde de ejaculaties. Tussen elke serie werd er een rustpauze van 5 minuten ingevoerd. Tijdens deze rustpauze werd er manueel rectale massage toegepast welke ook de uiteindelijke resultaten verbeterde. In de studie van Hermes et al. (2005) gebruikte men ook een aangepaste rectale probe. Hier werden ook 3 tot 5 series uitgevoerd, met elke serie bestaande uit 3 tot 4 elektrische stimulaties. De voltage en stroomsterkte werden bij elke serie opgedreven in het bereik tussen 5-20V en 200-900 mA zoals beschreven in het onderzoek van Roth et al. (2005).





Figuur 7. Hier ziet men de positie van de neushoorn en helpers tijdens de elektro-ejaculatie. (Roth et al., 2005)

Als men kijkt naar de resultaten van beide studies kan men besluiten dat er een zeker risico bestaat op urine contaminatie bij overstimulatie. Men moet ook rekening houden dat de minimale spermakwaliteit voor succesvol invriezen, een motiliteit van  $\geq 60\%$  en een concentratie van  $\geq 20 \times 10^6$  spermatozoa/ml moet hebben. In Tabel 3 worden de resultaten van de studie van Roth et al. (2005) vergeleken met deze van Hermes et al. (2005). In de studie van Roth et al. (2005) werden er 7 neushoorns gebruikt waarvan 4 Aziatische, 2 zwarte en 1 witte neushoorn. Over alle individuen heen werden 14 elektro-ejaculaties uitgevoerd, waarvan 13 resulteerden in ejaculatie. In de studie van Hermes et al. (2005) werden er 21 witte neushoorns gebruikt waarbij in totaal 36 elektro-ejaculaties werden uitgevoerd, deze waren allen succesvol.

|  | Volume (ml)  | Sperma concentratie ( $10^6$ /ml) | Sperma motiliteit (%) | Intact sperma (%) |
|--|--------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------|
| 34 ejaculaties (n) uit het onderzoek van Hermes et al. (2005) bij 21 witte neushoorns          |              |                                   |                       |                   |
| Sperma categorie I (n=21)  | 67,4 ± 16,4  | 75,8 ± 15,6                       | 86,8 ± 1,3            | 75,8 ± 3,2        |
| Sperma categorie II (n=5)  | 55,5 ± 18,0  | 40,8 ± 18,8                       | 67,0 ± 3,4            | 52,3 ± 7,4        |
| Sperma categorie III (n=8)   | 116,5 ± 33,4 | 18,9 ± 9,9                        | 33,8 ± 6,7            | 60,8 ± 9,1        |
| 7 goede en 7 slechte sperma fracties uit het onderzoek van Roth et al. (2005) bij 7 neushoorns |              |                                   |                       |                   |
| Goede kwaliteit fracties (n=7)   | 98,2 ± 21,8  | 37,1 ± 12,0                       | 80,7 ± 4,7            | 41,6 ± 6,1        |
| Slechte kwaliteit fracties (n=7)   | 84,9 ± 21,6  | 10,5 ± 6,4                        | 12,3 ± 7,5            | 21,0 ± 5,3        |

Tabel 3. Vergelijking tussen de sperma kwaliteit bij het gebruik van elektro-ejaculatie met gegevens uit het onderzoek van Roth et al. (2005) en Hermes et al. (2005).

Zoals hierboven wordt vermeld moeten spermastalen een motiliteit hebben van  $\geq 60\%$  en een concentratie van  $\geq 20 \times 10^6$  spermatozoa/ml om te kunnen gebruiken bij kunstmatige inseminatie of het invriezen. Bij het onderzoek van Hermes et al. (2005) voldoen de stalen van zowel categorie I als II aan deze waarde dit is 26 van de 34 verzamelde stalen ( $\pm 76\%$ ). In het onderzoek van Roth et al. (2005) werden de 7 goede kwaliteit spermastalen allemaal verzameld bij de Aziatische neushoorn. 1 individu had bij 3 van de 6 sperma -afnames goede kwaliteit sperma, bij het tweede individu was dit 2 van de 3 keer en de laatste twee allebei bij hun eerste en enige afname. In dit onderzoek produceerde de witte en twee zwarte neushoorns geen sperma van goede kwaliteit. Als men beide onderzoeken bekijkt werd er bij Hermes et al. (2005) in ongeveer 76% van de afnamen kwaliteitsvolle sperma verzameld. Bij Roth et al. (2005) was dit maar in 50% van de afnamen het geval en dit enkel bij de Aziatische neushoorns. In het algemeen lijkt de techniek van elektro-ejaculatie toch de meest bruikbare techniek voor kunstmatige inseminatie, IVF/ICSI en bij het aanleggen van een spermabank. De elektro -stimulatie techniek werd toegepast bij het sperma gebruikt voor KI en IVF (Hildebrandt et al., 2007; Hermes et al., 2008; Hermes et al., 2009; Hildebrandt et al., 2018).

Er is nog een belangrijke sperma-afname methode die verdient vernoemd te worden: de post - mortale spermaverzameling. Dit is erg belangrijk aangezien men een zo groot mogelijke gene-pool wil verzamelen en omdat er geen tot weinig sperma-afnames hebben plaatsgevonden bij het levende dier. Het onderzoek van Roth et al. (2016) heeft dit onderzocht bij 23 neushoorns (14 zwarte neushoorns, 3 witte neushoorns, 5 Aziatische neushoorns en 1 Sumatraanse neushoorn) over een periode van 16 jaar. Er werd een protocol gemaakt en dit werd aan AZA (Associations of Zoos and Aquariums) geaccrediteerde dierentuinen met neushoorns aangeleerd. Volgens dit protocol moet men zo snel mogelijk (lieft binnen de 1 à 2 uur) na de dood van een mannelijke neushoorn de testes samen met de epididymis en vas deferens in zijn geheel verwijderen. Het uiteinde van de vas deferens werd dichtgedaan met een ligatuur zodat het sperma er niet zou uitlopen bij transport. Nadien werd het in een plastic zakje geplaatst met enkele in 0,9% NaCl -oplossing gedrenkte watjes om het weefsel vochtig te houden. Het plastic zakje werd omwikkeld met een handdoek en dan op ice-packs geplaatst en in een styfoam transport container geplaatst. De temperatuur tijdens het transport bedroeg ongeveer 5°C. Bij aankomst in het laboratorium werden de testikels onderzocht op afwijkingen en de temperatuur werd ook gemeten. De Vas deferens en cauda epididymis werden vrij gedissecteed van het omliggende weefsel en met behulp van een sperma-extender werd het sperma er uit geflushd. Als dit niets opleverde werd de tubulus van de cauda epididymis verschillende keren ingesneden en het dikke sperma werd eruit geknepen in een petrischaaltje dat 0,5 – 1 ml sperma verdunner bevatten. Nadien werd het sperma getest op motiliteit, viabiliteit, beweegbaarheid en concentratie. Om te voldoen aan de criteria om ingevroren te worden moest het sperma een motiliteit hebben van  $\geq 30\%$  en een progressieve motiliteit van  $\geq 2,0$ . In de studie leverde 62% van de neushoorns een kwaliteit die aan deze criteria voldeed. Natuurlijke dood of euthanasie had geen effect. Wat wel effect kan hebben op de kwaliteit is op welk tijdstip na het overlijden het testis weefsel werd verwijderd. Voor 4 uur na het overlijden was de kwaliteit voldoende bij 75%, na 4 uur was dit slechts 25%. Maar in de studie was er een staal dat pas 51 uur na het overlijden werd verzameld en toch nog voldeed aan de criteria. Waarschijnlijk zijn er nog andere factoren die meespelen. Van de 23 verzamelde spermastalen werd er bij 11 neushoorns ontdooid sperma getest en bleek de gemiddelde motiliteit niet minder dan 41% te bedragen en niet minder dan 15% te zijn gedaald. In het algemeen is dit een succesvolle techniek en zeer nuttig om een zo groot mogelijke gene-pool te krijgen. Men kan de stalen ook nemen bij dieren die geen sperma-afname hebben ondergaan tijdens hun leven en eventueel bij wilde neushoorns die nog niet te lang zijn overleden.

## 2. SPERMA –BEWARING

Bij het langer bewaren van sperma is het eerst en vooral belangrijk een goede verdunner toe te voegen zodat het sperma beschermd is voor omgevingsinvloeden. Deze verdunners bestaan uit lipoproteïnes om de celmembraan te stabiliseren tegen koudeshock, glucose als energiebron en eventueel antibiotica om bacteriële overgroei te verhinderen. De cryoprotectants worden gebruikt bij het invriezen van sperma om kristalvorming te verminderen en op die manier schade van de spermacellen te vermijden. In het onderzoek van Hermes et al. (2005) werd berliner cryomedium (BC) gebruikt als verdunner en cryoprotectants. Er werden daarnaast ook verschillende andere spermaverdunners en cryoprotectants getest om te vergelijken. BC werd hier gekozen aangezien het al vaker succesvol werd gebruikt om sperma van bedreigde diersoorten in te vriezen. De BC cryoextender werd ook gebruikt bij het verkrijgen van het eerste kalf verwekt door kunstmatige inseminatie waarbij men ingevroren sperma gebruikte. In het onderzoek van Stoops et al. (2010) werden er twee verdunners: standaard paardenspermaverdunner (EQ) en magere melk/eidooier en suiker (SMEY) gebruikt. In dit onderzoek werden er ook twee cryoprotectants gebruikt: glycerol en dimethylsulfoxide (DMSO). Deze verdunners en cryoprotectants werden onderling vergeleken. In tabel 4 ziet u het effect van deze verdunners en cryoprotectants op de spermamotiliteit zowel voor het invriezen als na het ontdooien. In het onderzoek van Hermes et al. (2018) werden 3 verschillende cryoprotectants met elkaar vergeleken. Voor het onderzoek werd dit vergeleken bij 9 neushoorns (7 zuidelijke witte neushoorns, 1 zwarte en 1 Aziatische neushoorn). Het sperma werd genomen met elektrostimulatie en nadien verdund met een concentratie van  $100 \times 10^6$  spermatozoa/ml met BC, BotuCrio® en INRA Freeze®. In het experiment werd bij 5 neushoorns (3 witte en 2 zwarte neushoorns) gekeken wat het effect was van het al dan niet weghalen van het seminaal plasma op het ontdooid sperma.

Als men naar de bestanddelen van de verschillende verdunners en cryoprotectants gaat kijken werd BC gemaakt uit een bufferoplossing bestaande uit 2,41% TES, 0,58% Tris, 0,1% fructose en 5,5% lactose. Van deze buffer werd 100 ml gesupplementeerd met 20% eidooier, 8ml DMSO en 20 IE  $\alpha$ -tocopherol/ml. Deze oplossing werd dan een nacht bewaard bij een temperatuur van 4-6 °C. Na deze nacht werd het gecentrifugeerd aan 4500g voor een half uur waarna er een supernatans overbleef die alle beschermende elementen bevatte. De uiteindelijk concentratie aan eidooier is 15,6% en van DMSO is dit 6,25%. De spermaverdunner en cryoprotectants biladyl is commercieel beschikbaar voor de stier en bestaat uit 16,5% eidooier en 6,25% DMSO. De spermaverdunners en cryoprotectants gnt en Kenny gemodificeerd zijn commercieel beschikbaar voor de hengst en bestaan beide uit 16,5% eidooier en 6,25% DMSO. Van de spermaverdunners EQ en SMEY weet men dat het percentage aan eidooier in EQ tienmaal hoger is dan bij SMEY. De cryoprotectants BotuCrio® bestaat uit 1% glycerol en 4% methylformamide. De cryoprotectants INRA Freeze® bestaat uit 6% DMSO en glycerol.

|  | Spermamotiliteit voor invriezen (%) | Spermamotiliteit na ontdooien (%) | Spermamotiliteit behouden (%)±    | Concentratie voor invriezen (10 <sup>6</sup> spermatozoa/ml) | Concentratie na ontdooien (10 <sup>6</sup> spermatozoa/ml) |
|--|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Vergelijking van ejaculaten van 5 Zuidelijke witte neushoorns met het gebruik van 4 verschillende cryoextenders in het onderzoek van Hermes et al. (2005)              |                                     |                                   |                                   |  |  |
| Origineel sperma   | 57,0 ± 4,4                          | /                                 | /                                 | /  | /  |
| Berlin (BC)  | 62,6 ± 4,4                          | 27,6 ± 3,4                        | 49                                | /  | /  |
| Biladyl  | 53,0 ± 4,4                          | 25,2 ± 3,5                        | 44                                | /  | /  |
| Kenny gemodificeerd  | 57,0 ± 4,6                          | 24,6 ± 5,6                        | 44                                | /  | /  |
| Gent   | 47,0 ± 7,0                          | 17,5 ± 9,7                        | 32                                | /  | /  |
| 2 ingevroren spermastalen van een Zuidelijke witte neushoorn voor gebruik bij kunstmatige inseminatie bij beide werd BC gebruikt als cryoextender Hermes et al. (2009) |                                     |                                   |                                   |  |  |
| BC spermastaal 1   | 90                                  | 21                                | 23,3                              | 80   | 40   |
| BC spermastaal 2   | 90                                  | 78                                | 86,7                              | 80   | 40   |
| Vergelijking van 2 verschillende verdunners en cryoprotectants van 8 ejaculaties bij 6 Indische neushoorns uit het onderzoek van Stoops et al. (2010)                  |                                     |                                   |                                   |  |  |
| EQ en glycerol   | 78,80 ± 3,31                        | 50 – 55 %                         | ± 49 – 56 %<br>6 uur na ontdooien | 25,69 ± 4,05   | /  |
| EQ en DMSO   | 78,80 ± 3,31                        | 50 – 55 %                         | ± 49 – 56 %<br>6 uur na ontdooien | 25,69 ± 4,05   | /  |
| SMEY en glycerol   | 78,80 ± 3,31                        | 22 – 37 %                         | ± 25 – 36 %<br>6 uur na ontdooien | 25,69 ± 4,05   | /  |
| SMEY en DMSO   | 78,80 ± 3,31                        | 22 -37 %                          | ± 25 – 36 %<br>6 uur na ontdooien | 25,69 ± 4,05   | /  |
| Vergelijking van 3 verschillende cryoprotectants bij 9 neushoorns in het onderzoek van Hermes, Hildebrandt en Göritz (2018)  |                                     |                                   |                                   |  |  |
| BC   | 90,3 ± 1,2%                         | 44,2 – 51,7%                      | /                                 | 620,7±102,1  | /  |
| BotuCrio®  | 90,3 ± 1,2%                         | 64,8 – 75,6%                      | /                                 | 620,7±102,1  | /  |
| INRA Freeze®   | 90,3 ± 1,2%                         | 27,9 – 33,8%                      | /                                 | 620,7±102,1  | /  |

Tabel 4. Vergelijking van verschillende verdunners en cryoprotectants op de invloed hiervan op de spermakwaliteit voor het invriezen en na het ontdooien. (Hermes et al., 2005 en 2009, Stoops et al., 2010)

Uit deze tabel kan men afleiden dat met de verdunners EQ en BC het ontdooide sperma de beste motiliteit behouden in vergelijking met de motiliteit vóór het invriezen. De cryoextender BC was in 1 geval niet zo succesvol omwille van de uitgebreide DNA-fragmentatie. Dit is een probleem dat frequent voorkomt bij ingevroren en ontdooit sperma van de neushoorn. De BC-spermaverdunner verhoogde de motiliteit met ongeveer 5% in vergelijking tot gekoeld sperma zonder verdunner voor het invriezen. Bij de verdunners biladyl en gent daalt het en bij de verdunner Kenny gemodificeerd blijft het gelijk. De spermaverdunner EQ beschermde de spermacellen beter tegen de koeling dan

SMEY. Men vermoedt dat de eierdooier belangrijk was in de bescherming van het celmembraan aangezien de concentratie hiervan in EQ veel hoger is dan SMEY. Het is geweten dat eierdooier helpt de spermamotiliteit te behouden na invriezen, de hengst is hier een goed voorbeeld van. Als men gaat kijken naar het effect van de cryoprotectants glycerol en DMSO ziet men geen verschil in het behouden van de spermakwaliteit na het ontdooien. Deze twee werden vergeleken omdat glycerol toxisch is bij sommige hengsten. Bij één onderzoek dacht men dat sperma van een witte neushoorn hier wel gevoelig aan was maar na nader onderzoek bleek dit toch niet het geval. Er wordt vermoed dat de gevoeligheid species en individu afhankelijk is (Hermes et al., 2009 en 2005, Stoops et al., 2010 en Van de velde, 2014). In het onderzoek van Hermes et al. (2018) zag men wel verschil tussen de cryoprotectants. In dit onderzoek bleek dat Botucrio® een positief effect had op het behoud van de motiliteit na ontdooien. INRA Freeze® had dan weer een negatief effect op de motiliteit na ontdooien. Botucrio® bestaat uit een combinatie van methylformamide en glycerol, glycerol heeft een hoge cel-toxiciteit en zou hierdoor schade veroorzaken aan de spermacellen. Het methylformamide zorgt voor een vermindering van toxiciteit veroorzaakt door glycerol. Deze combinatie zou daarom een beter effect hebben dan de op zichzelf staande DMSO of glycerol welke een hoge toxiciteit hebben. Het positieve effect van Botucrio® op de motiliteit na ontdooien is ook gerapporteerd bij hengsten. De cryoprotectants INRA Freeze® heeft dan weer een negatief effect op de motiliteit van het sperma na ontdooien. Deze cryoprotectants bestaat enkel uit glycerol en DMSO. Deze bestanddelen hebben op zichzelf al een celdestructief effect. Ook is het eigeel hier vervangen door eigeel plasma en eigeel fosfolipide, wat geen positieve invloed heeft op de motiliteit van het sperma na ontdooien. Dit is verschillend van BC cryoprotectants dat bestaat uit DMSO. In het onderzoek werd getest of het seminaal plasma een negatief effect zou hebben op de spermakwaliteit na ontdooien. Dit bleek geen verschil te maken.

## 2.1 AFKOELPROCEDURE

Hermes et al. (2005) bestudeerde de afkoelprocedure om het effect van afkoeling te bekijken op spermamotiliteit. Er werden hiervoor 7 hoge kwaliteit ejaculaten gebruikt met een motiliteit van  $81\% \pm 9\%$ . Deze ejaculaten werden verdund met BC met een 1:1 verhouding in buisjes van 50 ml. Deze buisjes werden in een koelkast geplaatst van  $4 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . De spermastalen bereikten een temperatuur van  $4 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 90 tot 120 minuten. De stalen werden 24 uur in de koelkast bewaard. Nadien werden ze gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur gehouden en dan 10 – 15 minuten geincubeerd bij  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Op deze stalen werd de motiliteit van de spermatozoa bepaald. Nadien kon men besluiten dat de spermatozoa van neushoorns niet gevoelig is aan koeling aangezien de spermamotiliteit ongeveer constant bleef.

## 2.2 INVRIESPROCEDURE

Het invriezen van sperma is zeer belangrijk voor het opzetten van een spermabank. Iets dat van groot belang is aangezien de neushoorn een bedreigde diersoort is. Bij de techniek met BC werden er 14 ejaculaties gebruikt van 12 verschillende mannelijke dieren met een spermamotiliteit  $\geq 50\%$ . De spermastalen werden verdund met BC in een verhouding van 1:1. Nadien werden ze gecentrifugeerd ( $800 \times g$ ) gedurende 10 min bij kamertemperatuur dit om het seminaal plasma te verwijderen. Nadien werden de stalen opnieuw verdund met BC tot dat men viermaal het oorspronkelijk volume bekwam. Nadien begon het invriesproces. Eerst werden de stalen op een temperatuur van  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gebracht, dit duurde 2 uur. Vervolgens werden de stalen in  $0,5\text{cc}$  rietjes, 2 cm boven  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  vloeibaar stikstof gehouden voor 15 minuten. Hierna werden de rietjes in de vloeibare stikstof tank geplaatst om hier bewaard te blijven (Hermes et al., 2005).

Bij de techniek met EQ of SMEY als verdunner, en glycerol en DMSO als cryoprotectants, werd er ook eerst een 1:1 verdunning gemaakt met EQ of SMEY. Deze stalen werden dan in een ruimte of bad geplaatst van 4°C en werden zo gedurende 1,5 uur gekoeld tot 4°C. Vervolgens werden de gekoelde stalen verdund 1:1 met gekoelde extender die 10% cryoprotectants bevat (glycerol of DMSO). Deze verdunning gebeurde gradueel om de 20 minuten tot het eindstadium welke 5% cryoprotectants bevatte. Deze verdunning werd vervolgens in een 0,5cc rietje geplaatst. De stalen werden onmiddellijk gekoeld voor 10 minuten en nadien in de vloeibare stikstof geplaatst (Stoops et al., 2010).

# OESTRUSCYCLUS EN MONITORING

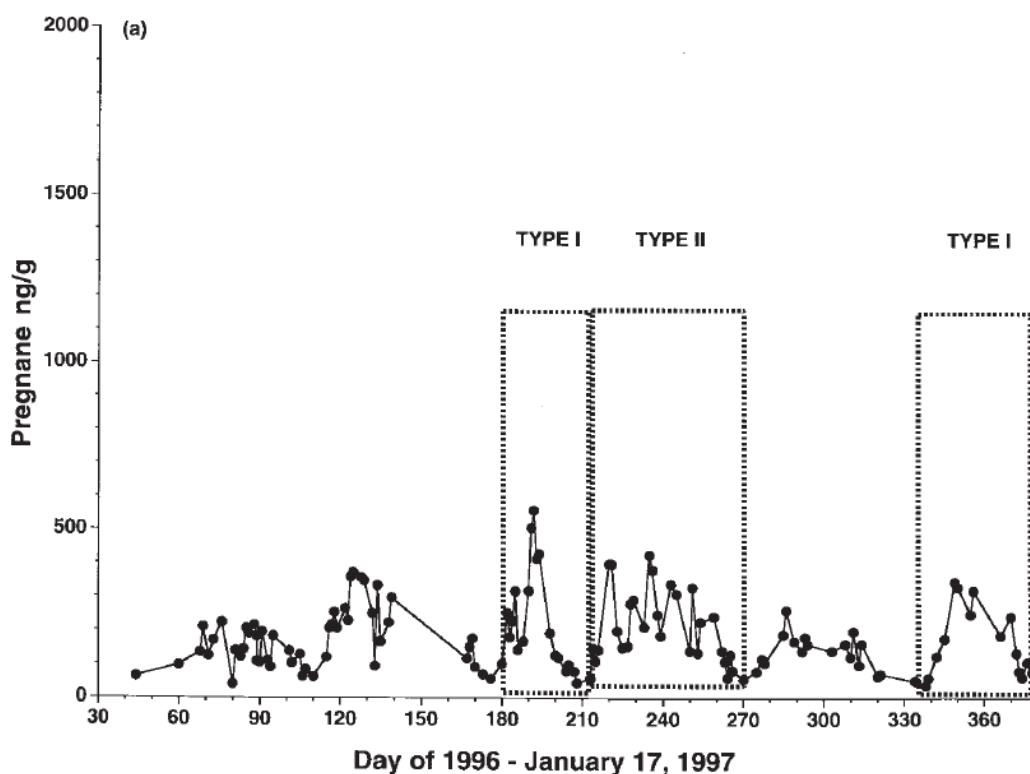
## 1. DE NORMALE OESTRUSCYCLUS

Beide neushoorn species zijn poly-oestrisch en niet-seizoenaal en ovuleren spontaan. De folliculaire activiteit start op de leeftijd van 3 - 4 jaar maar de eerste ovulatie begint pas rond de leeftijd van 4- 5 jaar (Garnier et al., 2002; Hermes et al., 2006) .

### 1.1. DE WITTE NEUSHOORN

Bij de witte neushoorn wordt aangenomen dat er 2 types van cycli zijn. Er wordt gesproken over een type I cyclus die een lengte bedraagt van  $35.4 \pm 2.2$  dagen volgens het onderzoek van Patton et al. (1999). Dit onderzoek is gebaseerd op 5 dieren. In het onderzoek van Brown et al. (2001), waar er van de 13 dieren die werden geobserveerd maar 7 cyclische waren, werd er op basis van de progesteronen in de faeces besloten dat de gemiddelde lengte van de type I cyclus  $32.8 \pm 1.8$  bedroeg zie grafiek 2.

Als men naar de type II cyclus gaat kijken wordt er in het onderzoek van Patton et al. (1999) gesproken over een gemiddelde lengte van  $65.9 \pm 2.4$  dagen, waarbij de interluteale fase constant blijft tegenover de type I cyclus maar er een verlengde luteale fase optreedt. In het onderzoek van Brown et al. (2001) is de lengte van de type II cyclus  $70.1 \pm 1.6$  dagen zie grafiek 2.



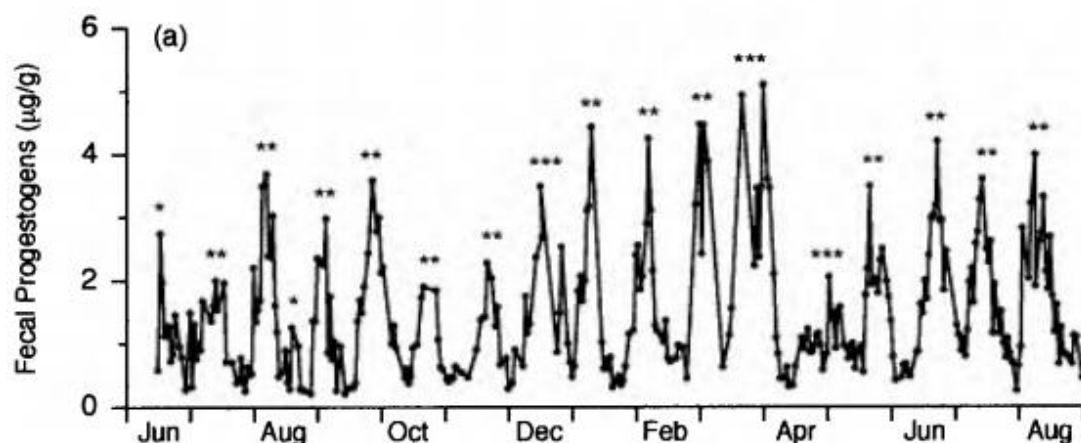
Grafiek 2.: Deze grafiek geeft de pregnane faeces concentratie weer bij één zuidelijke witte neushoorn (Sinyaa) die zowel type I als type II cyclussen vertoont over een periode van 1 jaar (Brown et al., 2001).

Beide type van cycli kunnen voorkomen bij 1 vrouwelijk dier. Dit werd al meerdere malen geobserveerd. Uit verschillende onderzoeken kon men besluiten dat er nog geen dracht heeft plaatsgevonden na paring bij een type II cyclus. Waarschijnlijk is de type II cyclus een veruiterlijking van een reproductie pathologie (Patton et al., 1999; Hermes et al, 2006; Roth et al., 2006).

Deze onderzoeken zijn alle gebaseerd op in gevangenschap gehouden witte neushoorns en niet representatief voor witte neushoorns in het wild. Men moet rekening houden dat wanneer deze dieren in gevangenschap worden gehouden, er bij ongeveer 50% van de vrouwelijke dieren periodes van inactiviteit optreden variërend van enkele maanden tot jaren. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het constant cyclisch zijn over verschillende jaren zonder optreden van dracht waardoor er een oöcyt depletie bekomen wordt (Hermes et al., 2004, roth et al., 2006, Mettrione, 2010).

## 1.2. DE ZWARTE NEUSHOORN

Bij de zwarte neushoorn is de situatie iets eenvoudiger. Er wordt aangenomen dat de gemiddelde lengte van de cyclus 26 dagen bedraagt. Hier is ook wel enige variatie op. Bij de studie van Garnier et al. (2002) die 6 wilde vrouwelijke zwarte neushoorns uit Zimbabwe monitorde aan de hand van fecale progesteron concentraties en het reproductie gedrag, werden er wel zogenaamde type II cycli teruggevonden. Hierbij vond men een type IIa die wordt gekenmerkt door een verlengde luteale fase. Deze verlengde luteale fase wordt waarschijnlijk veroorzaakt door embryonale dood. Naast dit type werd er ook een type IIb beschreven dat wordt gekenmerkt door een verlengde folliculaire fase. Deze dieren waren anovulatoir. Dit type IIb vond meestal in oktober plaats. Dit is de warmste maand in Zimbabwe, er wordt dus aangenomen dat deze verlenging wordt veroorzaakt door hittestress. Deze type II cycli werden wel enkel vermeld in de studie van Garnier et al. (2002). In deze studie werd type IIa maar in 7% van de cycli teruggevonden en type IIb in 13% van de cycli. In de studie van Brown et al. (2001), waarbij 16 vrouwelijke zwarte neushoorns werden gemonitord allen gelokaliseerd in verschillende dierentuinen, werd er ook enige variatie vastgesteld. Bij 18% van de cycli werd er een cyclus vastgesteld die minder dan 20 dagen bedroeg en bij 20% van de cycli werd er een cyclus van meer dan 32 dagen vastgesteld zie grafiek 3.



Grafiek 3. Deze grafiek geeft de progesterone concentratie weer van 1 vrouwelijke zwarte neushoorn uit de studie van Brown et al. (2001). \* staat voor een cyclus van minder dan 20 dagen, \*\* staat voor een normale cyclus tussen de 20 – 30 dagen en \*\*\* staat voor een cyclus langer dan 30 dagen.

Er werd in de studie van Brown et al. (2001) gevonden dat van 16 vrouwelijke dieren er 10 een anoestrus periode vertoonde van 2 tot 10 maanden. Men moet hierbij wel rekening houden dat bij 50% van deze gevallen dit postpartum plaatsvond.



## 2. MONITORING VAN DE OESTRUSCYCLUS

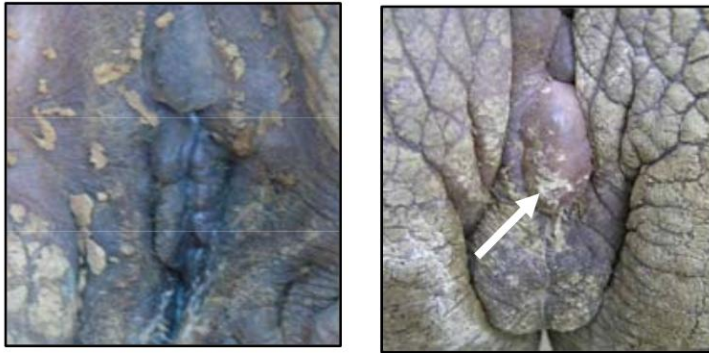
De monitoring van de oestruscyclus is belangrijk bij het uitvoeren van kunstmatige inseminatie, embryotransfer, .... Dit kan op verschillende manieren gebeuren. Hieronder worden enkele veel gebruikte methodes besproken.

Tijdens de oestrus zijn er gedragsveranderingen zichtbaar, dit kan gebruikt worden als een hulpmiddel. Deze gedragsveranderingen zijn tijdens de oestrus maximaal 24 uur zichtbaar. In figuur 8 ziet men een gedragsobservatieformulier van vrouwelijke witte neushoorns in oestrus uit de 'Rhino husbandry manuel' van Metrione (2010). Hierop ziet men dat de vrouwelijke neushoorn tijdens de oestrus kleine beetjes urineert, de staart hoger houdt, de vrouwtjes meer interesse vertonen voor de mannetjes en omgekeerd, de vrouwtjes laten de mannetjes de anogenitale regio onderzoeken en de mannetjes mogen het hoofd op hun romp leggen (Radcliffe et al., 1997; Metrione, 2010; Van de velde, 2014).

| Observer(s)               | Name: | Studbook #: | Month: | Year: | Date |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
|---------------------------|-------|-------------|--------|-------|------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|
| Behavior                  | 1     | 2           | 3      | 4     | 5    | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |  |  |  |  |
| F urine squirt            |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| F interest in male        |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Aggression with male      |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Agg. betw. M & F's S.P.   |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Male interest in F        |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| M anogenital investigates |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| M chin rests              |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| M hiccing approach        |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| M mounts F                |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Copulation                |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Housed with male          |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |
| Enclosure co-inhabitants  |       |             |        |       |      |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |  |  |  |  |

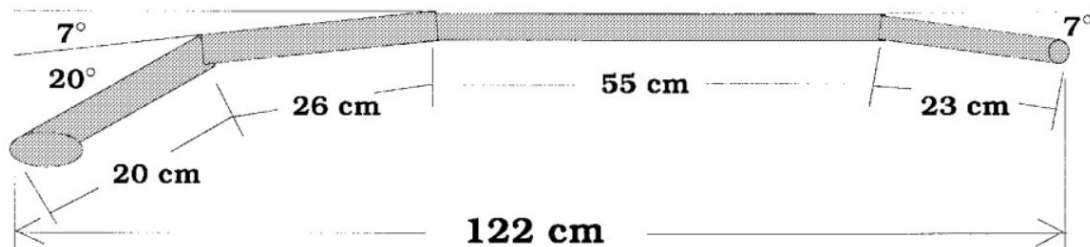
Figuur 8. Gedragsobservatietabel voor de vrouwelijke witte neushoorn in oestrus Metrione (2010)

In het onderzoek van Carter et al. (2007) werd er een scoresysteem van 0 tot 3 gemaakt om de zwelling van de vulva te quoteren. Dit kan helpen om het tijdstip van de oestrus te bepalen. Het scoresysteem is als volgt: 0 'geen zwelling' en typisch voor anoestrus of luteale fase, 1 'matige verdikking', 2 'gezwollen' en 3 'zeer gezwollen' en typisch voor oestrus. Deze zwelling wordt zichtbaar als blazen en niet als een diffuse zwelling. In figuur 9 is deze vulva zwelling zichtbaar.



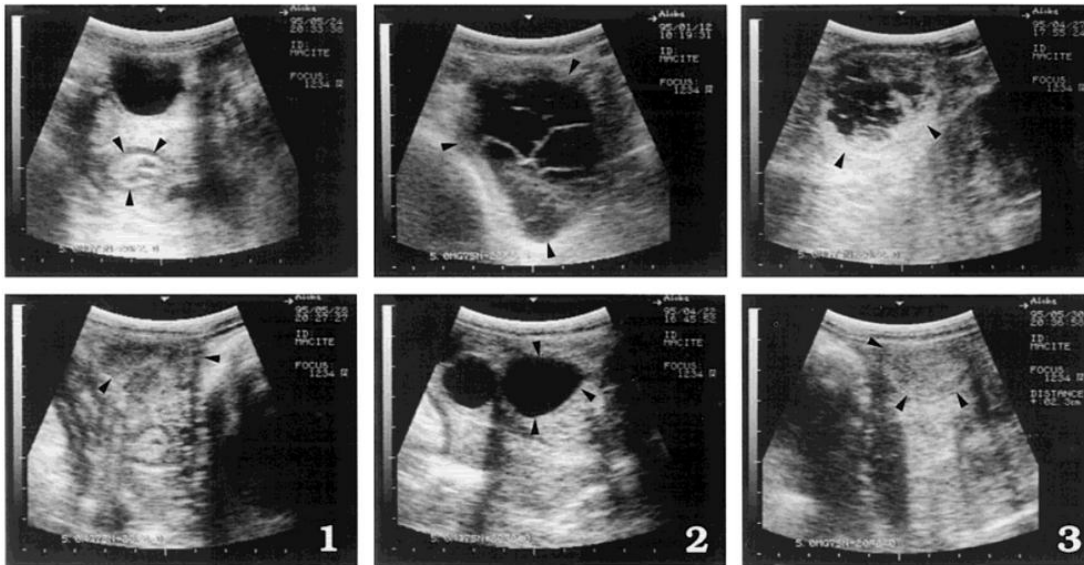
Figuur 9. Links ziet men een score 0 'geen zwelling' dit is typisch zichtbaar bij anoestrus of luteale fase. Rechts ziet men een score 3 'zeer gezwollen' waarbij de blaasachtige zwelling is aangeduid met een pijl. De rechtse foto komt overeen met een neushoorn in oestrus.

Men kan de oestruscyclus ook bepalen aan de hand van transrectale echografie. Het nadeel van deze techniek is dat de dieren dit gewoon moeten worden en het enkel realistisch is bij dieren gehouden in gevangenschap. Om een succesvolle transrectale echografie uit te voeren moest men een verlengstuk maken want manueel is het niet mogelijk om de ovaria in beeld te brengen. In het onderzoek van Radcliffe et al. (1997) werd er met PVC zo een verlengstuk gemaakt met een lengte van 1,22m waarin een kromming werd verwerkt zodat de ovaria beter in beeld komen. Dit verlengstuk staat voorgesteld in figuur 10. Er werd gebruik gemaakt van een 5 MHz convexe array sonde die werd bevestigd aan een transducer kabel en het gemaakte verlengstuk.



Figuur 10. Het PVC-verlengstuk van de transrectale echo uit het onderzoek van Radcliffe et al. (1997).

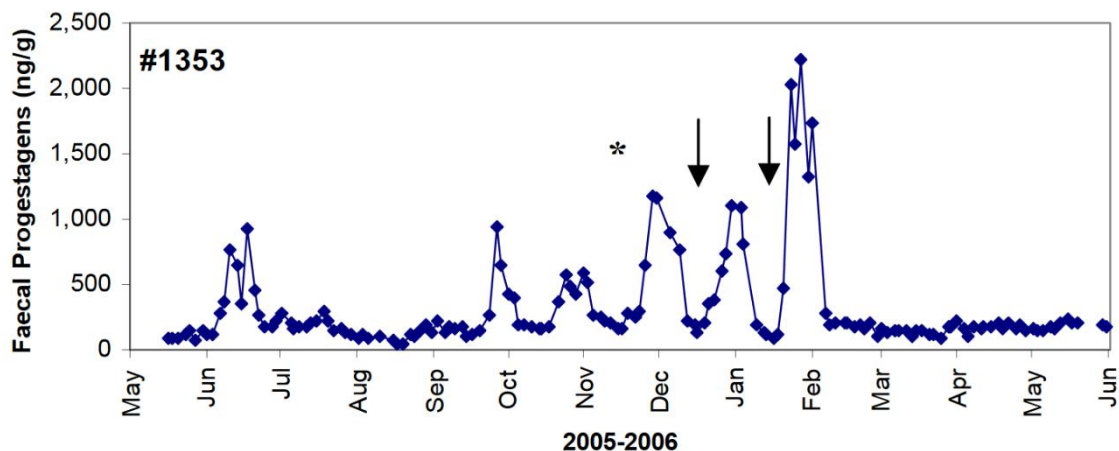
Op de echo was zichtbaar dat de pre-ovulatoire follikel 48 uur voor de ovulatie een diameter bereikte tussen de 28 en 32 mm. Hier zag men in 3 van de 4 gevallen een verandering in vorm. De pre-ovulatoire follikels kregen een peervorm in plaats van een sferische vorm. De ovulatie was zichtbaar als een collaps van de follikel. Het contralaterale ovarium was in deze periode weinig actief. De vermelde veranderingen zijn zichtbaar in figuur 11 (Radcliffe et al., 1997).



Figuur 11: Beeld 1(boven): Er is een pre-ovulatoire follikel 3 dagen voor dekking zichtbaar en met de pijlen is een kleine restant van een corpus luteum aangeduid. Beeld 1 (onder): Overblijfsel van de ovulatie 1 dag na dekking. Beeld 2 (boven): Een grote folliculaire structuur met gelijkenissen van een hemorrhagische follikel dat gezien wordt bij het paard. Beeld 2 (onder): Een peervormige pre-ovulatoire follikel. Beeld 3 (boven): Een corpus hemorrhagicum met een centrale klont. Beeld 3 (onder): Een homogeen corpus luteum. (Radcliffe et al., 1997)

Een laatste veel gebruikte methode is de pregnane bepaling in faeces. Deze methode heeft het voordeel tegenover transrectale echografie dat het minder invasief is en ook toepasbaar bij dieren die in het wild leven. De faeces moet bij het verzamelen relatief vers zijn en kan nadien bewaard worden bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Om de concentratie aan pregnane te bepalen in de faeces wordt er gebruik gemaakt van progestageen immunoassay. Hierbij wordt er een monoklonaal antiserum gemaakt tegen 4-Pregnane-11-ol, 20-dione femisuccinate. Dit antiserum reageert met het progesteron aanwezig in de faeces (Patton et al., 1999; Garnier et al., 2002; carter et al., 2007).

In het onderzoek van Carter et al. (2007) werd vermeld dat de concentratie aan progestageen tijdens de interluteale en anovulatoire fase  $145,4 \pm 21,0$  ng/g was. Tijdens de luteale fase was dit  $535,2 \pm 152,5$  ng/g zie grafiek 4.



Grafiek 4: In deze grafiek is de  $20\alpha$ -progestagene concentratie weergegeven van een witte neushoorn. De verticale pijlen geven voortplantingsactiviteit weer. Het sterretje geeft een level 2 vulva zwelling weer wat wijst op oestrus (Garnier et al., 2002).

## OESTRUS EN OVULATIE-INDUCTIE

---

In gevangenschap gehouden neushoorns (vooral de witte neushoorns) vertonen heel vaak voortplantingsproblemen en zijn hierdoor niet in staat om nakomelingen te produceren. Er werd aangetoond dat in ongeveer 60% van de in gevangenschap gehouden vrouwelijke witte neushoorns niet in staat zijn om zich voor te planten. De dieren kunnen effectief irreversibel acyclisch zijn. In dit geval heeft oestrus-inductie geen effect. Het kan echter ook gaan over dieren met een onregelmatige cyclus of met een verlengde anoestrus. Hierbij kan oestrus-inductie wel helpen (Roth et al., 2006; van de velde, 2014; Ververs, 2015).

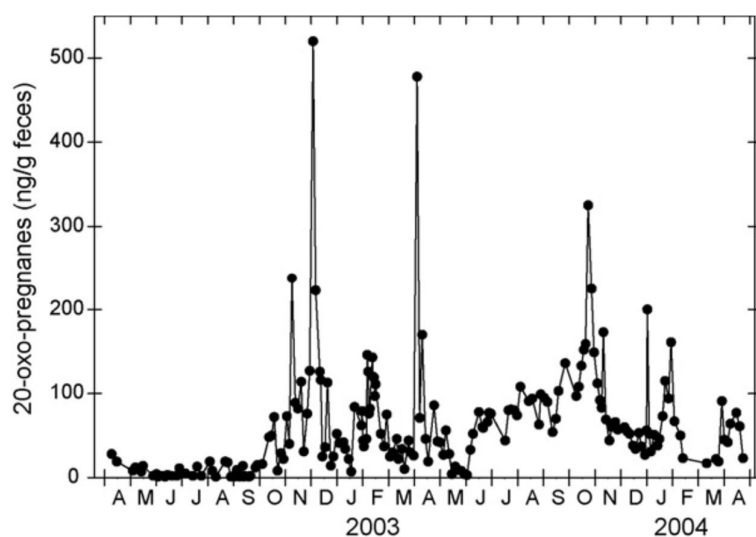
In het onderzoek van Hermes et al. (2012) werd er gebruik gemaakt van een synthetisch progesteron Chlormadinone acetaat (CMA) in combinatie met hcg, injecteerbaar GnRH analoog of een GnRH analoog implantaat om de ovulatie te induceren. In het onderzoek werden er 14 vrouwelijke witte neushoorns zonder luteale activiteit en 3 met regelmatige luteale activiteit gebruikt. Deze dieren werden gedurende 6 maanden tot enkele jaren opgevolgd met behulp van fecale progesteron concentratie. In totaal werden over de 17 dieren 35 oestrus-inducties uitgevoerd. Eerst werd er gedurende 45 dagen CMA toegediend. Dit progesteron preparaat CMA onderdrukt de oestrus cyclus en hield het dier zo langer in de luteale fase ook na het verdwijnen van het corpus luteum. De behandeling van 45 dagen was langer dan de cycluslengte van een witte neushoorn. Door deze langere periode kon de verdere behandeling gewoon gestart worden zonder het stadium van de oestrus cyclus te kennen. Nadien,  $9,5 \pm 0,2$  dagen na het stoppen van de CMA-behandeling, werd er hcg of GnRH toegediend om de ovulatie te induceren. Deze methode is nuttig omdat bij een transrectale echografie sedatie moet gebruikt worden en men dit niet te vaak wenst te doen. Bij deze methode ondervinden de dieren dus minder stress.

Desloreline acetaat (GnRH analoog) wordt ook regelmatig bij de merrie gebruikt om de ovulatie te induceren. Hierbij wordt er een ovuplant (desloreline acetaat implant) ingebracht subcutaan op het moment van een beginnende oestrus (aanwezigheid van een follikel van 30mm). Hierbij komen 80% van de merries binnen 24 uur tot ovulatie. De GnRH zou ook een invloed hebben op de folliculaire groei (Brinsko et al., 2011). Bij neushoorns heeft dit preparaat een vergelijkbaar effect. In het onderzoek van Hildebrandt et al. (2007) werd er gebruik gemaakt van een GnRH analoog om de ovulatie te induceren bij KI. Ook het onderzoek van Hermes et al. (2009a) maakt gebruik van een GnRH analoog om de ovulatie te induceren bij KI met ingevroren sperma. In beide onderzoeken werd het GnRH analoog toegediend in aanwezigheid van een Graafse follikel ( $\pm 30$  mm). Het GnRH analoog werd toegediend kort na de KI en resulteerde in beide onderzoeken tot een succesvolle dracht.

## KUNSTMATIGE INSEMINATIE (KI)

De KI-techniek is een zeer goede techniek in het kader van de reproductieproblematiek van in gevangenschap gehouden neushoorns. Het is wel noodzakelijk dat het voortplantingsstelsel gezond is en dat de dieren niet acyclisch zijn. Als dit niet zo is moet men overstappen naar andere technieken zoals IVF of ICSI. KI wordt ook gebruikt om de tussenkalftijd te verkleinen die normaal tussen de 1,5 – 3,5 jaar is (Hildebrandt et al., 2007). Hieronder worden twee onderzoeken besproken die gebruik maken van KI om een kalf te bekomen. Het eerste onderzoek gebruikte vers sperma, het tweede onderzoek gebruikte diepvriessperma.

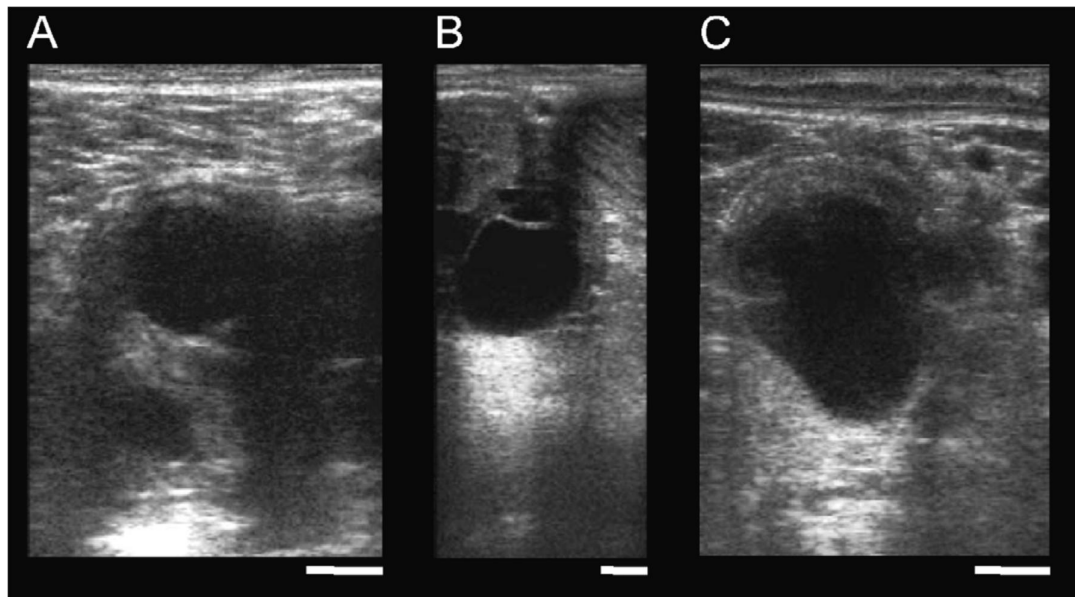
In het onderzoek van Hildebrandt et al. (2007) werd er op een 24-jarige onregelmatig cyclerende nullipare witte neushoorn kunstmatige inseminatie (KI) toegepast. Na de partus werd er op dit dier bij de eerste post -partum ovulatie opnieuw KI toegepast. In de studie van Hildebrandt et al. (2007) werd het progesteron in de faeces gemeten gedurende 6 jaar en dit 2 keer per week. De laatste paar maanden werd het progesteron ook 1 maal per week gemeten met een serum staal genomen uit de oorvenen. In grafiek 5 hieronder ziet u een overzicht van 20-oxo-pregnane metingen genomen van de faeces gedurende een periode van 33 maanden. Uit de grafiek kan men besluiten dat het dier een onregelmatige luteale activiteit heeft. Wanneer men een mannelijk dier bij haar plaatste vertoonde deze op bepaalde momenten vergrote interesse in de vrouwelijke neushoorn. Hieruit kon men besluiten dat het vrouwelijke dier waarschijnlijk wel pre -ovulatoire follikels had maar deze niet ovuleerde.



Grafiek 5. Deze grafiek van het onderzoek van Hildebrandt et al. (2007) geeft een overzicht van 20-oxo-pregnane metingen in de faeces van de 24 -jarige onregelmatig cyclerende witte neushoorn over een periode van 33 maand

Nadien werd er ook gebruik gemaakt van een rectale echo van het reproductiestelsel en de ovaria. Dit een week voor de verwachte gedragsveranderingen en 6 dagen voor de geïnduceerde ovulatie. Bij deze echo werden er 2,0 cm grote follikels gevonden op het rechter ovarium. De dag voor en de dag van de geïnduceerde ovulatie werd er opnieuw een echo gemaakt. De grootte van de follikels waren respectievelijk 3,0 en 3,2 cm. Op dit ogenblik kon men ook een vergroting zien van de diameter van de bifurcatio uteri, deze bedroeg 2,2 cm (6 dagen voor) tot 3,8 cm (dag van de geïnduceerde ovulatie). Er kon aangenomen worden dat de follikel van 3,2 cm een Graafse follikel was, klaar voor ovulatie. Op figuur 12 ziet u de evolutie van de follikels. Op dat moment werd de

kunstmatige inseminatie uitgevoerd en kort nadien werd een GnRH analoog toegediend voor de ovulatie-inductie (zie hierboven oestrus en ovulatie-inductie).



Figuur 12. Deze transrectale echografie geeft de evolutie van de follikels weer. A. transrectale echografie op 6 dagen voor de geïnduceerde oestrus met een diameter van 22mm, B. Follikel 1 dag voor de geïnduceerde oestrus met een diameter van 32 mm, C. De peervormige Graafse follikel op de dag van de oestrus inductie met een diameter van 38 mm (Hildebrandt et al., 2007).

Voor de KI werd het dier onder algemene anesthesie gebracht. Voor de inseminatie werd er sperma gebruikt verkregen door elektro-ejaculatie dat, zoals hierboven vermeld, de beste sperma -afname methode is voor een goede spermakwaliteit. Als eerste werd de steriele inseminatie katheter doorheen de vaginale opening en hymenaal membraan (aanwezig in een vrouwelijk dier dat nog nooit gepaard heeft) ingebracht. Nadien werd er rectaal gepalpeerd naar de cervix en werd de inseminatie katheter met rectale begeleiding in de cervix gebracht en verder naar de ovulerende kant in de baarmoederhoorn begeleid. Er werd met transrectale echo eerst nagegaan of de katheter juist zat voordat de katheter werd geledigd. Na de KI werd een GnRH analoog toegediend om de ovulatie te garanderen. Voor de KI zelf werd er een speciaal ontworpen katheter gebruikt om de harde en lange cervix te kunnen overbruggen. De katheter moest een rechte hoek overbruggen en diende daarom zeer flexibel te zijn. De dracht werd gediagnosticeerd aan de hand van de verhoging van pregnane in het serum en nadien werd er een echo uitgevoerd om de dracht te bevestigen. Als de concentratie aan pregnane in het serum 70 dagen na de KI nog steeds hoog was, werd er een echo uitgevoerd om de dracht te bevestigen. Normaal kan men via echo al op 15 dagen de dracht bevestigen maar het dier moet hiervoor gesedeerd worden en dit wil men niet doen zonder enige zekerheid. Daarom werd er gewacht op een bevestiging met de pregnane verhoging in het serum. Deze KI met vers sperma resulteerde uiteindelijk op dag 480 van de dracht in een doodgeboren kalf. Het kalf overleed aan een vroegtijdige placenta loslating.

Na de dracht werd de involutie van de uterus opgevolgd aan de hand van transrectale echografie. Op dag 16 postpartum werd in de dragende uterus hoorn een grote hoeveelheid vloeistof waargenomen en op de ovaria werden enkel kleine (>1 cm) follikels gezien. Op dag 26 werd dit onderzoek herhaald

en was er nog maar een kleine hoeveelheid vloeistof aanwezig en er werd een dominante follikel van 2,6 cm waargenomen op een van de ovaria. Op dag 30 was de endometriale diameter terug normaal en was er nog maar een minimale hoeveelheid vloeistof aanwezig en een peervormige graafse follikel van 3,2 cm. In het algemeen kan men stellen dat de uterus involutie ongeveer 30 dagen in beslag neemt. Na 30 dagen zal de uterus zijn normale vorm terug hebben gekregen en zal het intra-uteriene vloeistof verdwenen zijn. Rond dag 30 post-partum zal er ook terug een pre-ovulatoire follikel verschijnen. Het dier werd op dag 30 geïnsemineerd en er werd wederom een GnRH analoog toegediend. Deze KI resulteerde in een levend geboren vrouwelijk kalf.

Uit dit alles kan men besluiten dat de post-partum oestrus manipuleerbaar en bruikbaar is voor inseminatie. Het gebruik van deze oestrus zou de inter-kalf tijd verminderen. Bij in het wild levende witte neushoorns is dit interval tussen de 2,63 – 3,45 jaar. Dit is lang en aangezien deze dieren bedreigd zijn is het gunstig om deze post -partum oestrus te kunnen gebruiken.

In een studie van Hermes et al. (2009a) werd KI succesvol uitgevoerd met ingevroren sperma. In deze studie werd een vrouwelijke witte neushoorn gebruikt welke al 2 drachten had doorgemaakt bekomen door KI met vers sperma. Hier werd de oestruscyclus opnieuw gemeten aan de hand van progesteron in serum en faeces. Hetzelfde protocol voor ovulatie-inductie en inseminatie werd gebruikt. Het dier werd geïnsemineerd tijdens de eerste post-partus oestrus, 28 dagen post -partus, met ingevroren sperma met een spermac concentratie van  $40 \times 10^6$  cellen/ml, een spermamotiliteit van 21% en een normale morfologie van 25% na ontdooien. Deze KI resulteerde niet in een dracht, dit waarschijnlijk door de ondermaatse spermakwaliteit. De tweede inseminatie werd uitgevoerd met een ander spermastaal van dezelfde stier. Deze keer waren de spermawaarden na het ontdooien van een betere kwaliteit. De concentratie bedroeg  $40 \times 10^6$  cellen/ml, de motiliteit was 78% en met een normale morfologie van 61%. Deze KI werd uitgevoerd op de 3<sup>de</sup> post-partus oestrus en resulteerde in een dracht met de geboorte van een levend mannelijk kalf.

Op basis van deze studies kan men besluiten dat men zowel ingevroren als vers sperma kan gebruiken voor KI. Ook is het gebruik van de eerste post -partus oestrus een mogelijkheid. Deze techniek is dus een goede oplossing voor vrouwelijke dieren met een onregelmatige cyclus zodat deze toch de mogelijkheid hebben drachtig te worden. Ook kan KI gebruikt worden om de inter-kalf tijd te verminderen. Het gebruik van ingevroren sperma is ook interessant om na het overlijden van een stier nog kalveren ervan te kunnen bekomen en om sperma van stieren wereldwijd te kunnen gebruiken.

## IN VITRO FERTILISATIE (IVF) EN INTROCYTOPLASMATISCHE SPERMA-INJECTIE (ICSI)

---

IVF en ICSI zijn technieken die hulp zouden kunnen bieden bij vrouwelijke neushoorns met irreversibele afwijkingen aan het vrouwelijk reproductie stelsel. Zoals hierboven vermeld kan bij deze dieren KI niet meer worden uitgevoerd. Aangezien ongeveer 50% van de in gevangenschap gehouden vrouwelijke neushoorns (voornamelijk witte neushoorns) met dit soort problematiek kampt zou dit een meerwaarde kunnen zijn. Momenteel staat deze techniek nog in zijn kinderschoenen en werd ze maar enkele malen succesvol toegepast.

### 1. OVARIËLE SUPERSTIMULATIE

De superstimulatie is belangrijk om het aantal preovulatoire follikels te verhogen. Deze techniek wordt ook beschreven bij de merrie. Hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een GnRH-analoog, dit wordt ook gebruikt bij de neushoorns (Brinsko et al., 2011).

In de studie van Hermes et al. (2009) werden 13 vrouwelijke neushoorns in anoestrus gebruikt. Deze dieren waren infertiel ten gevolge van uteriene of para-ovariële letsels. Er werd gebruik gemaakt van deslorelin acetaat, een GnRH -analoog, om superstimulatie van de ovaria te bekomen. Er werd driemaal desloreline toegediend met telkens 2 dagen tussen (D0, 2 en 4). De ovariële status beoordeelde men op dag 6 of 7 met echografie en aan de hand van fecaal progesteron. Er werd bij alle dieren die desloreline toegediend kregen een continue folliculaire groei waargenomen en een toename van het aantal follikels. Bij het meten van het fecale progesteron werd bij 9 dieren, 2 weken na de behandeling, een stijging gezien. Hieruit kon men besluiten dat de dieren geovuleerd hadden na de ovariële superstimulatie.

### 2. OVUM PICK-UP (OPU)

Bij de neushoorn maakt men gebruik van een transrectale benadering van de ovaria om oöcyten te kunnen verzamelen. Men kan geen gebruik maken van een transvaginale of transabdominale benadering zoals dit het geval is bij het paard. De transvaginale benadering heeft men geprobeerd maar er was geen mogelijkheid om de ovaria te bereiken door de grote afstand van ongeveer 50 cm tussen de craniale vaginawand en de ovaria (Hildebrandt et al., 2018). De transabdominale benadering was dan weer geen optie door de dikke huid en de ver naar achterliggende ribben. Dit belemmerde een makkelijke laproscopische benadering en de kans op complicaties was hoog bij deze methode. Uiteindelijk was de transrectale benadering de beste optie. Hierbij probeert men de contaminatie van het abdomen met fecale bacteriën te beperken door slechts eenmaal het rectum te perforeren en het rectum zo proper mogelijk te maken. Tot nog toe zijn er nog geen problemen geweest met infectie na toepassing van deze techniek. De techniek werd al meermaals succesvol uitgevoerd (Pennington en Durrant, 2018).

In het onderzoek van Hermes et al. (2009) werden drie neushoorns gebruikt (een witte en twee zwarte neushoorns) om OPU op uit te voeren. Er vond 1 collectie per neushoorn plaats. Voor de procedure werden de dieren onder algemene anesthesie gebracht. De kleinere zwarte neushoorn bracht men in sternale positie. Voor de witte neushoorn was dit niet mogelijk en deze werd in laterale decubitus gelegd. Eerst werd het rectum schoongemaakt met verschillende clisma's en de perineale regio werd geschrubd. Nadien plaatste men een steriele handdoek craniaal in het rectum om passage van faeces tijdens de punctie te vermijden. Er werd gebruik gemaakt van een enkelvoudige -opening naald welke in een naaldhouder werd gezet. Het inbrengen van de naald



gebeurde onder echografische begeleiding. Eerst werd de ovaria gevisualiseerd en nadien werd de naald door de wand van het rectum gebracht in de follikels. De follikels werden geaspireerd in een emcare flush vloeistof. Tijdens de aspiratie werden de follikels verscheidene keren geflushd en geaspireerd om op deze manier de cumulus oöcyten complexen (COC) los te krijgen van de follikelwand. Nadien verzamelde men de oöcyten met behulp van een EmCon filter. Uiteindelijk werden er met de 6 OPU-procedures in totaal 29 COC's verzameld.

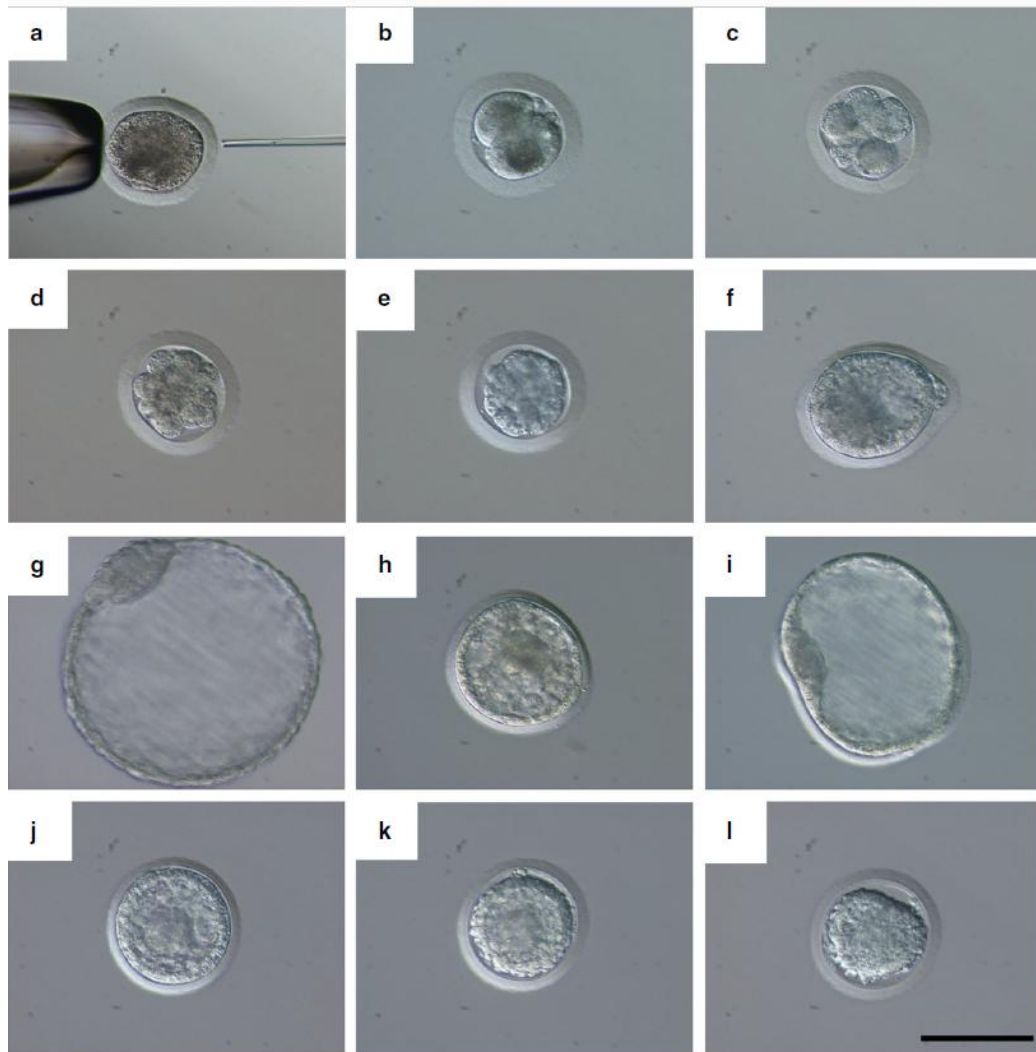
De COC's bekomen door OPU waren immatuur en moesten eerst in vitro maturatie ondergaan voordat men ze kon gebruiken voor IVF of ICSI. Voor IVM werden de COC's eerst 3 maal gespoeld in het aspiratie medium en 2 maal in IVM-medium (bestaat uit neushoorn oestrus serum, follikel stimulerend hormoon, LH, estradiol, ...). Vervolgens werden de COC's in een cultuur geplaatst met IVM medium en minerale olie gedurende 23 tot 56 uur.

In een onderzoek van Hildebrandt et al. (2018) werden 18 OPU-procedures uitgevoerd waarbij 314 follikels werden geflushd en uiteindelijk kon men zo 83 oöcyten verzamelen (26,4%). In dit onderzoek werden deze zelfde methodes gebruikt als bij het onderzoek van Hermes et al. (2009). De oöcyten recovery rate was afhankelijk van het individueel dier. Nadien werden de oöcyten voor een tijdspanne van 36 tot 44 uur in een IVM-medium geplaatst. Uit de 83 oöcyten waren er 32 die matureerde tot een metafase II. Deze waren bruikbaar voor ICSI.

### 3. IN VITRO FERTILISATIE (IVF) EN INTRACYTOPLASMATISCHE SPERMA INJECTIE (ICSI)

In het onderzoek van Hermes et al. (2009) heeft men succesvol een 4-cellige zwarte neushoorn embryo bekomen door IVF. Eén oöcyt van een zwarte neushoorn die succesvol maturatie onderging, met het hierboven besproken IVM-proces, werd gebruikt voor ICSI maar na 48 uur was er nog steeds geen celdeling zichtbaar. 3 Oöcyten van de 2 zwarte neushoorns ondergingen succesvolle maturatie en werden gebruikt voor IVF. Hierbij ontstond één 4-cellig embryo.

In het onderzoek van Hildebrandt et al. (2018) werd ICSI gebruikt op de 32 oöcyten die matureerden. Er werden 19 oöcyten geïnjecteerd met sperma van de zuidelijke witte neushoorn waarvan er 6 deling ondergingen en uiteindelijk 3 zich ontwikkelden tot een blastocyt. De 13 andere oöcyten werden geïnjecteerd met sperma van de noordelijke witte neushoorn waarvan 6 deling ondergingen en uiteindelijk 4 ontwikkelden tot blastocyt. Het duurde tussen de 9 à 12 dagen voordat de embryo's het blastocyt stadium bereikten. Ongeveer 21% van de geïnjecteerde oöcyten ontwikkelden zich tot een bruikbaar embryo. In figuur 13 is de ontwikkeling van de geïnjecteerde oöcyten tot blastocyt zichtbaar.



Figuur 13. Embryo ontwikkeling van ICSI tot blastocyt. a. ICSI op een metafase II oöcyt. b. Een 2 -cellige embryo 48 uur na ICSI. c. Een 8 -cellige embryo op 5 -6 dagen na ICSI. e. Een morula op 7 -9 dagen na ICSI. f. een blastocyt bekomen van een zuidelijke witte neushoorn oöcyt met zuidelijke witte neushoorn sperma. g. Expansie van het embryo na verwijderen van de zona met behulp van pronase (2 dagen). h. Een hybride blastocyt bekomen door een oöcyt van een zuidelijke witte neushoorn te injecteren met sperma van een mannelijke noordelijke witte neushoorn. i. Een van de hybride blastocysten na dat deze op 10 dagen uit de zona brak (Hildebrandt et al., 2018).

#### 4. EMBRYOTRANSFER

Tot nog toe is deze techniek niet ontwikkeld voor neushoorns. De beste oplossing is momenteel de embryo's in te vriezen om ze in de toekomst in te planten bij een draagmoeder wanneer de techniek wel ontwikkeld is. Een van de grote problemen bij embryotransfer is de strakke en sterk kronkelende cervix die overbrugd moet worden. Ook zou er een protocol moeten gemaakt worden om de draagkoe te synchroniseren met de donorkoe.

## 5. EMBRYO CRYOPERSERVATIE:

In het onderzoek van Hildebrandt et al. (2018) werden van de 7 bekomen blastocysten 3 (2 hybride en 1 zuidelijke witte neushoorn blastocyt) gebruikt voor cryoperservatie in afwachting van het ontwikkelen van embryotransfer in neushoorns. Voor het invriezen van de embryo's werden geëxpandeerde blastocysten (D11 – D13) gebruikt met een grootte  $<200\mu\text{m}$ . Het invriesprotocol van paarden en runderen werd toegepast. Er werd gebruik gemaakt van glycerol als cryoprotectants en het invriesproces gebeurde geleidelijk. De embryo's werden eerst op een 5% glycerol oplossing geplaatst gedurende 5 minuten aan kamertemperatuur en nadien in een 10% glycerol oplossing gedurende 20 minuten eveneens aan kamertemperatuur. De embryo's werden nadien in rietjes geplaatst en rustig gekoeld. Eerst werden de embryo's in de rietjes gekoeld aan  $-6^{\circ}\text{C}$  in een methanol bad gedurende 10 minuten (tot het gehele rietje bevroren was). Nadien werd de temperatuur verlaagd aan een snelheid van  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  tot  $-32^{\circ}\text{C}$ . Als laatste werden de rietjes in de vloeibare stikstoftanks geplaatst om ze te bewaren.

## ANDERE TECHNIEKEN

---

Door de huidige status van de noordelijke witte neushoorns zijn onderzoekers verscheidene technieken aan het ontwikkelen om deze soort van uitsterven te redden. Dit met het celmateriaal dat verzameld werd over de jaren heen (zie bijlage 1).

Men kan ondertussen artificiële gameten ontwikkelen door in vitro differentiatie van pluripotente stamcellen. Deze pluripotente stamcellen zijn in staat om zich in alle soorten weefsels te ontwikkelen die aanwezig zijn in een dier. Pluripotente stamcellen zijn voornamelijk aanwezig in een jong embryo maar kunnen geïsoleerd worden en geproduceerd worden in celculturen. Deze embryonale stamcellen kan men dan injecteren in embryo's welke nog geïmplanteerd moeten worden in een surrogaatmoeder. Het ontwikkelde individu zal dan kiemcellen van de geïnjecteerde embryonale cellen bevatten en kan op deze manier het genotype doorgeven aan de volgende generatie. Deze techniek is nog niet succesvol bij grote dieren (Saragusty et al., 2016).

Een andere manier om een artificiële gameet te produceren is door gebruik te maken van een somatische cel welke opnieuw geprogrammeerd wordt tot een pluripotente stamcel. Deze pluripotente stamcellen hebben gelijkaardige eigenschappen als embryonale stamcellen en kunnen ontwikkelen in allerlei soorten weefsels. Deze pluripotente stamcellen kunnen ook ontwikkelen in functionele gonaden of in gameten. Deze ontwikkeling van gameten of gonaden uit pluripotente stamcellen is momenteel enkel succesvol bij muizen. Men was wel al succesvol in het ontwikkelen van pluripotente stamcellen uit fibroblasten van noordelijke witte neushoorns. Het risico aan deze techniek is de kans op het ontwikkelen van mutaties (Saragusty et al., 2016).

Een andere mogelijkheid zou een nucleaire transfer van een somatische cel in een oöcyt zijn. Deze techniek bestaat al 20 jaar en werd al bij 20 verschillende soorten succesvol uitgevoerd. Hierbij zou men het nucleus van een somatische cel kunnen plaatsen in een oöcyt. De embryo's bekomen bij deze techniek, zouden wanneer ze de blastocyst stadium bereikt hebben, met embryotransfer in een surrogaatmoeder kunnen geplaatst worden. Men zou de bekomen embryo's ook kunnen gebruiken voor embryonale stamcellen (Saragusty et al., 2018).

Deze boven vermelde technieken zijn nog niet ontwikkeld bij neushoorns en het kan nog enkele jaren duren tot deze technieken wel toegepast kunnen worden. Deze technieken zijn waarschijnlijk essentieel om de noordelijke witte neushoorn van uitsterven te behoeden.

## DISCUSSIE

---

Deze literatuurstudie heeft vele geassisteerde reproductietechnieken in beeld gebracht die een oplossing zouden kunnen bieden voor de witte en zwarte neushoornpopulatie. De meeste staan echter nog niet op punt. Sommige technieken zoals embryotransfer en klonen werden nog nooit toegepast bij deze diersoort. Spermabewaring en kunstmatige inseminatie (KI) zouden een oplossing kunnen bieden voor de zwarte en zuidelijke witte neushoorn. Voor de noordelijke witte neushoorn is dit geen optie meer en moet er gehoopt worden op de technieken klonen, in vitrofertilisatie (IVF) en intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI).

Uit deze literatuurstudie kan men besluiten dat de beste optie momenteel is om zo veel mogelijk sperma, eicellen en ander celmateriaal te verzamelen. Op deze manier kan men een genenbank opzetten die men kan aanwenden wanneer IVF, ICSI en klonen wel ontwikkeld zijn. Het opzetten van een genenbank is erg belangrijk, zodat men niet dezelfde problemen krijgt als bij de noordelijke witte neushoorn. Bij deze subspecies is dit niet tijdig gebeurd waardoor er niet veel celmateriaal beschikbaar meer is. Hierdoor is er maar van 14 noordelijke witte neushoorns celmateriaal aanwezig (zie bijlage 1), deze basis is niet breed genoeg om een nieuwe populatie uit te bouwen.

Het verzamelen van sperma is een techniek die al langer bestaat en relatief succesvol is. Bij de neushoorn is elektro- ejaculatie met een aangepaste probe de beste techniek om sperma te verzamelen met de gewenste kwaliteit. Het enige probleem bij spermaverzameling met elektro- ejaculatie is dat voor deze techniek de dieren onder algemene anesthesie moeten worden gebracht, wat toch altijd een risico is en niet zeer frequent kan uitgevoerd worden. Bij manuele massage moet het dier niet onder algemene anesthesie gebracht worden maar hier is de spermakwaliteit niet hoog genoeg en het aanleren van de techniek neemt minstens een jaar training in beslag. Een andere optie die zeker en vast ook een meerwaarde kan bieden is het post-mortem verzamelen van sperma. Er werd hiervoor een protocol ontwikkeld en aangeleerd aan AZA (Associations of Zoos and Aquariums) geaccrediteerde diertuinen. Dit bleek kwaliteitsvol sperma op te leveren. Deze techniek zou aan alle diertuinen en dierenparken in het bezit van neushoorns moeten worden aangeleerd. Hierbij kan er spermamateriaal verzameld worden van dieren waar er geen mogelijkheden waren om dit tijdens het leven te doen. Dit zou eventueel ook toegepast kunnen worden bij wilde dieren indien het dier nog niet te lang dood is. Men start de procedure best binnen de 4 uur na sterfte maar er is al bruikbaar sperma gecollecteerd 51 uur post-mortem (Roth et al., 2016). Al dit verzameld sperma kan ingevroren worden en bijna eindeloos in vloeibaar stikstof bewaard worden.

Wat betreft het bewaren en de latere verwerking van het sperma zijn al meerdere onderzoeken uitgevoerd over welke spermaverdunners en cryoprotectants een positief effect hebben op het bewaren van sperma. De berliner cryomedium (BC) cryoprotectants zorgt voor een spermamotiliteit die voldoende hoog is na het ontdooien. Standaard paardenspermaverdunner (EQ) zorgt voor een goede bewaring van sperma en zorgt in combinatie met glycerol of DMSO als cryoprotectants ook voor een voldoende spermakwaliteit na ontdooien. Recent is er opnieuw onderzoek gedaan naar cryoprotectants om een zo goed mogelijke kwaliteit van sperma te bekomen na ontdooien zodat KI, IVF en ICSI kunnen toegepast worden. Hierbij bleek BC cryoprotectants, welke tot nu toe het frequentst werd gebruikt, niet de beste optie maar wel de Braziliaanse spermaverdunner (BotuCrio®). Deze cryoprotectant heeft, ten opzichte van BC, als voordeel, dat het minder toxisch is voor spermacellen. Met al deze kennis kan men een spermabank op punt zetten voor de zwarte neushoorn en de zuidelijke witte neushoorn om deze later te kunnen gebruiken wanneer de technieken KI, IVF, ICSI,... op punt staan.

Bij de vrouwelijke dieren zijn er nog wat vragen over de normale oestruscyclus en het effect van het in gevangenschap leven op deze cyclus. Men weet dat 60% van de in gevangenschap gehouden witte neushoorns niet in staat zijn om zich op natuurlijke wijze voort te planten. Sommige hiervan zijn irreversibele acyclisch en gaan zich nooit op natuurlijke wijze kunnen voortplanten. Bij andere gaat het over een onregelmatige cyclus of een verlengde anoestrus. De monitoring van deze in gevangenschap gehouden dieren is belangrijk en kan op verschillende manieren worden uitgevoerd. De opvolging kan gebeuren met transrectale echografie. Het nadeel hiervan is dat het enkel toepasbaar is bij in gevangenschap gehouden dieren en er sedatie moet uitgevoerd worden. Een andere betrouwbare techniek is het bepalen van pregnane in de faeces. Dit kan men toepassen bij dieren zowel in het wild als in zoo's maar is minder accuraat dan een transrectale echografie. Bij dieren die een onregelmatige cyclus of een verlengde anoestrus vertonen kan er oestrus en ovulatie-inductie worden toegepast. Dit kan gevolgd worden door natuurlijke dekking of door KI. Het gebruik van Deslorelin (GnRH analoog) is effectief. Dit kan bij de aanwezigheid van een Graafse follikel of na een behandeling met CMA (synthetisch progesteron). Bij het gebruik van CMA is het voordeel dat men het stadium van de oestruscyclus niet moet kennen en de dieren niet gesedeerd moeten worden. Na de ovulatie-inductie kan men KI toepassen. Dit kan zeer nuttig zijn voor in gevangenschap gehouden dieren waarbij natuurlijke dekking moeilijk verloopt. Ook kan het de interkalf tijd verminderen door gebruik te maken van de eerste ovulatie na de partus. Deze techniek werd nog maar enkele keren succesvol toegepast en staat nog in zijn beginfase maar kan in de toekomst zorgen voor een hogere aantal geboortes van neushoornkalveren in dierentuinen en dierenparken. Voor de noordelijke neushoorn komt deze techniek jammer genoeg te laat vermits de twee overgebleven vrouwelijke noordelijke witte neushoorns irreversibele problemen hebben aan het geslachtstelsel. Het gebruik van de techniek bij de zuidelijke witte neushoorn en zwarte neushoorn kan evenwel een meerwaarde bieden bij reproductie programma's in dierenparken. Het is al succesvol gebeurd met ingevroren sperma en kan toegepast worden bij dieren waarbij de natuurlijke dekking niet vlot verloopt.

Bij de noordelijke witte neushoorn zou enkel IVF, ICSI of klonen het uitsterven van de soort kunnen voorkomen. IVF zorgde maar één keer tot de ontwikkeling van een blastocyst. Recent boekte men meer succes met ICSI waarbij men 7 blastocysten ontwikkelde. Deze techniek is nog in een experimentele fase en er bestaat nog geen mogelijkheid tot embryotransfer. Momenteel kan men enkel de embryo's invriezen. IVF en ICSI zijn technieken die kunnen toegepast worden bij vrouwelijke neushoorns die een irreversibele afwijking hebben aan hun geslachtstelsel en die niet meer in staat zijn een dracht uit te dragen. Op deze manier gaat het genetisch materiaal van deze individuen niet verloren, dit is zeer belangrijk wanneer men nog een kleine populatie overhoudt. Bij de noordelijke witte neushoorn kunnen beide overgebleven vrouwelijke neushoorns geen dracht meer uitdragen en zijn de enige opties IVF of ICSI. Hierbij zou het ontwikkelde embryo ingeplant kunnen worden bij een vrouwelijke zuidelijke witte neushoorn. Embryotransfer is nog niet toegepast en dus de enige mogelijkheid is momenteel embryo's te ontwikkelen en in te vriezen om dan in de toekomst in draagmoeders geplaatst te worden. Deze ontwikkelde embryo's zouden ook gebruikt kunnen worden om met de embryonale stamcellen artificiële gameten te ontwikkelen. Dit is tot nu toe enkel in muizen succesvol uitgevoerd en is nog niet voor de nabije toekomst. Als deze techniek op punt staat zou men het weinige bestaande celmateriaal nuttig kunnen aanwenden.

Op termijn is nucleaire transfer van somatische cellen in een oöcyt onmisbaar. Op deze manier kan men met het bestaande celmateriaal van de noordelijke witte neushoorns terug mannelijke en vrouwelijke dieren bekomen waarmee men vervolgens terug kan gaan voortplanten (zowel natuurlijke dekking als geassisteerde voortplanting). De gemaakte embryo's met de nucleaire transfer zouden wel in een surrogaatmoeder van de zuidelijke witte neushoorn moeten geplaatst

worden. Al deze technieken zijn nog niet ontwikkeld voor de neushoorn en zijn nu nog geen realistische optie.

Als conclusie van deze literatuurstudie kan men stellen dat voornamelijk het verzamelen en bewaren van sperma en ander celmateriaal op punt staat. Het belangrijkste zou zijn om van zo veel mogelijk dieren sperma en celmateriaal te verzamelen om die later te kunnen gebruiken. Het gebruik van KI zou ook een meerwaarde kunnen bieden om het aantal kalveren te verhogen bij in gevangenschap gehouden neushoorns. Voor de noordelijke neushoorn is het waarschijnlijk te laat en moet men leren uit de fouten die bij deze soort gemaakt werden. Bij deze subspecies is er maar van 14 individuen sperma en celmateriaal bewaard, waardoor men waarschijnlijk hybriden gaat moeten maken met zuidelijke witte neushoorns om inteelt te voorkomen. Als men de soort toch nog van het uitsterven willen redden moet men wachten op de ontwikkeling van klonen, IVF en ICSI. Door het recente succes met ICSI zou men embryo's kunnen ontwikkelen door gebruik te maken van OPU bij de overblijvende twee vrouwelijke individuen die met ICSI worden bevrucht met ingevroren sperma. Momenteel is embryotransfer niet mogelijk en kan men de embryo's invriezen. Nadien zouden deze embryo's in een zuidelijke witte neushoorn kunnen geplaatst worden. Hierbij zijn nog enkele moeilijkheden te overbruggen en rijst de vraag of dit zou lukken en wat de problemen kunnen zijn bij het plaatsen in andere subspecies. Met deze nieuw ontwikkelde dieren kan men dan verder voortplanten met natuurlijke dekking, KI, ICSI,... . Het is duidelijk dat er nog veel werk te verrichten valt rond dit onderwerp en dat daar haast bij is om deze soorten te behoeden van uitsterven. Het wordt een moeilijke opdracht om deze subspecies nog te kunnen redden maar door de huidige interesse van veel mensen met expertise in dit vakgebied is er zeker nog hoop.

## REFERENTIELIJST:

---

- Amin, R., Thomas, K., Emslie, R.H., Foose, T.J., Strein, N., 2006. An overview of the conservation status of and threats to rhinoceros species in the wild. *International Zoo Yearbook* 40, 96-117.
- Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Schumacher, J., Love, C.C., Hinrichs, K., Hartmann, D., 2011. Assisted reproductive technology. In: *Manuel of equine Reproduction*, third edition. Mosby Elsevier, Missouri, US, pp. 302-312.
- Brown, J.L., Bellem, A.C., Fouralcer, J., Wildt, D.E., Roth, T.L., 2001. Comparative Analysis of Gonadal and Adrenal Activity in the Black and White Rhinoceros in North America by Noninvasive Endocrine Monitoring. *Zoo Biology* 20, 463-486.
- Carter, L., Stephens, S., Goold, M., Morrow, C., 2007. Reproductive monitoring in captive southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Proceedings of the Australasian Regional Association of Zoological Parks and Aquaria Conference Wellington, New Zealand*
- Garnier, J.N., Holt, W.V., Watson, P.F., 2002. Non-invasive assessment of oestrous cycles and evaluation of reproductive seasonality in the female wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*). *Reproduction* 123, 877-889.
- Godfrey, R.W., Pope, E., Dresser, B.L., Olsen, J.H., 1991. Gross anatomy of the reproductive tract of female black (*Diceros bicornis michaeli*) and white rhinoceros (*ceratotherium simum simum*). *Zoo Biology* 10, 165-175.
- Hermes, R., Göritz, F., Blottner, S., Walzer, C., Göltenboth, R., Schwarzenberger, F., Rudolph, M., Hildebrandt, T.B., 2001. Evaluation of fertility in captive male white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) – semen assessment and preservation. *Verh. Ber. Erkr. Zootiere* 40, 173-176.
- Hermes, R., Göritz, F., Portas, T.J., Bryant, B.R., Kelly, J.M., Maclellan, L.J., Keeley, T., Schwarzenberger, F., Walzer, C., Schnorrenberg, A. et al., 2009. Ovarian superstimulation, transrectal ultrasound-guided oocyte recovery, and IVF in Rhinoceros. *Theriogenology* 72, 959-968.
- Hermes, R., Goeritz, F., Saragusty, J., Sos, E., Molnar, V., Reid, C.E., Schwarzenberger, F., Hildebrandt, T.B., 2009a. First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology* 71, 393-399.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Blottner, S., Walzer, C., Silinski, S., Patton, M.L., Wibbelt, G., Schwarzenberger, F., Göritz, F., 2005. Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* 63, 219-238.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Goeritz, F., 2004. Reproductive problems directly attributable to long-term captivity-asymmetric reproductive aging. *Animal Reproduction Science* 82-83, 49-60.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Göritz, F., 2018. Cryopreservation in rhinoceros-setting a new benchmark for sperm cryosurvival. *Plus One* 13, 1-12.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., 2011. Rhinoceros theriogenology. In: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine: Current therapy*, vol. 7. Mosby Elsevier, Missouri, US, pp. 546-561.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Walzer, C., Göritz, F., Gray, C., Niemuller, C., Schwarzenberger, F., 2012. Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Theriogenology* 78, 1217-1223.
- Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Walzer, C., Goritz, F., Patton, M.L., Silinski, S., Anderson, M.J., Reid, C.E., Wibbelt, G., Tomasova, K. Et al., 2006. The effect of long non-reproductive periods on the genital health in captive female white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *Ceratotherium simum cottoni*). *Theriogenology* 65, 1492-1515.
- Hildebrandt, T.B., Hermes, R., Colleoni, S., Diecke, S., Holtze, S., Renfree, M.B., Stejskal, J., Hayashi, M., Drukker, M., Loi, P., et al., 2018. Embryos and embryonic stem cells from the white rhinoceros. *Nature communications*.



- Hildebrandt, T.B., Hermes, R., Walzer, C., Sos, E., Molnar, V., Mezösi, L., Schnorrenberg, A., Silinski, S., Streich, J., Schwarzenberger, F., et al., 2007. Artificial insemination in the anoestrous and the postpartum white rhinoceros using GnRH analogue to induce ovulation. *Theriogenology* 67, 1473–1484.
- Mastromonaco, G.F., King, W.A., 2007. Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: can the technology become a practical reality?. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 748-761.
- Metrione, L., Eyres, A., 2010. Crisis for rhinos. In: *Rhino husbandry manual*. International rhino foundation, Fort Worth, Texas, USA, pp. 8-13.
- Patton, M.L., Swaisgood, R.R., Czekala, N.M., White, A.M., Fetter, G.A., Montagne, J.P., Reiches, R.G., Lance, V.A., 1999. Reproductive cycle length and white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observations of mating behaviour. *Zoo Biology* 18, 111-127.
- Pennington, P.M., Durrant, B.S., 2018. Assisted reproductive technologies in captive rhinoceroses. *Mammal review*, 1-12.
- Radcliffe, R.W., Czekala, N.M., Osofsky, S.A., 1997. Combined serial ultrasonography and fecal progesterone analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*ceratotherium simum simum*): preliminary results. *Zoo Biology* 16, 445-456.
- Roth, T.L., Stoops, M.A., Atkinson, M.W., Blumer, A.S., Campbell, M.K., Cameron, K.N., Citino, S.B., Maas, A.K., 2005. Semen collection in rhinoceroses (*rhinoceros unicornis*, *diceros bicornis*, *ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36, 617-627.
- Roth, T.L., Stoops, M.A., Robeck, T.R., O'Brein, J.K., 2016. Factors impacting the success of Post-mortem sperm rescue in the rhinoceros. *Animal Reproduction Science* 167, 20-30.
- Roth, T.L., 2006. A review of the reproductive physiology of rhinoceros species in captivity. *International Zoo Yearbook* 40, 130-143.
- Saragusty, J., Diecke, S., Drukker, M., Durrant, B., Ben-Nun, I.F., Galli, C., Göritz, F., Hayashi, K., Hermes, R., Holtze, S., et al., 2016. Rewinding the process of mammalian extinction. *Zoo Biology* 35, 280-292.
- Schaffer, N.E., Bryant, W., Agnew, D., Meehan, T., Beehler, B., 1998. Ultrasonographic monitoring of artificially stimulated ejaculation in three rhinoceros species (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29, 386-393.
- Schaffer, N.E., Beehler, B., Jeyendran, R.S., Balke, B., 1990. Methods of Semen Collection in an ambulatory Greater One-Horned Rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Zoo Biology* 9, 211-221.
- Schaffer, N.E., Foley, G.L., Gill, S., Pope, C.E., 2001. Clinical implications of rhinoceros reproductive tract anatomy and histology. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 32, 31-46.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Tomasova, K., Vahala, J., Meister, J., Goodrowe, K.L., Zima, J., Straub, G., Lynch, M., 1998. Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*ceratotherium simum*). *Animal Reproduction Science* 53, 173-190.
- Stoops, M.A., Atkinson, M.W., Blumer, E.S., Campbell, M.K., Roth, T.L., 2010. Semen cryopreservation in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Theriogenology* 73, 1104 – 115.
- Stoops, M.A., O'Brien, J.K., Roth, T.L., 2011. Gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Theriogenology* 76, 1258-1265.
- Van de Velde, M., 2014. Voortplantingsproblematiek bij de vrouwelijke witte neushoorn; hot topic in verband met toenemende stroperij. Masterproef, Master of Veterinary Medicine, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, België.
- Van de Velde, M., 2014. De rol van de mannelijke neushoorn in de voortplantingsproblematiek. Masterproef, Master of Veterinary Medicine, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, België.

Ververs, C., van Zijl Langhout, M., Govaere, J., Van Soom, A., 2015. Features of reproduction and assisted reproduction in the white (*ceratotherium simum*) and black (*dicerus bicornis*) rhinoceros. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 84, 175-185.

## BIJLAGE 1

| Name          | Sex | Studbook# | Sample type  | Sample location |
|---------------|-----|-----------|--|-----------------|
| Lucy          | F   | 28        | Established cell culture                                 | SDZSP           |
| Dinka         | M   | 74        | Established cell culture                                 | SDZSP           |
| Angalifu      | M   | 348       | Frozen spermatozoa                                       | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Frozen testicular tissue                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Cryopreserved adipose tissue                             | SDZSP           |
|               |     |           | Frozen spermatozoa                                       | IZW             |
| Nasima        | F   | 351       | iPSCs (unpublished)                                      | SDZSP/TSRI      |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
| Sudan         | M   | 372       | Live animal  | OP              |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Cryopreserved tissue                                     | OP              |
|               |     |           | Frozen spermatozoa (Quality issues <sup>a</sup> )        | OP              |
|               |     |           | Frozen spermatozoa                                       | IZW             |
| Saut          | M   | 373       | Established cell culture                                 | SDZSP           |
| Nola          | F   | 374       | Frozen spermatozoa                                       | IZW             |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
| Nadi          | F   | 376       | Cryopreserved adipose tissue                             | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Cryopreserved ovarian tissue                             | SDZSP           |
| Nesari        | F   | 377       | Only DNA, no cell culture                                | SDZSP           |
| Nasi (hybrid) | F   | 476       | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Frozen tissue (Quality unknown <sup>b</sup> )            | IZW             |
| Suni          | M   | 630       | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | IZW             |
|               |     |           | Established cell culture                                 | FLI             |
|               |     |           | Frozen tissue (Quality unknown <sup>c</sup> )            | OP              |
|               |     |           | Frozen testicular tissue (Quality unknown <sup>c</sup> ) | OP              |
|               |     |           | Frozen spermatozoa (Quality issues <sup>d</sup> )        | IZW             |
|               |     |           | Frozen spermatozoa                                       | OP              |
| Nabire        | F   | 789       | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | IZW             |
|               |     |           | Established cell culture                                 | FLI             |
|               |     |           | Cryopreserved tissue                                     | IZW             |
|               |     |           | Blood in EDTA & heparin                                  | IZW             |
|               |     |           | iPSCs (unpublished)                                      | MDC             |
|               |     |           | iPSCs (unpublished)                                      | HCM             |
|               |     |           | Live animal  | OP              |
| Najin         | F   | 943       | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | IZW             |
|               |     |           | Established cell culture                                 | FLI             |
|               |     |           | Cryopreserved tissue                                     | OP              |
|               |     |           | Frozen blood in EDTA                                     | IZW             |
| Fatu          | F   | 1305      | Live animal  | OP              |
|               |     |           | Established cell culture                                 | SDZSP           |
|               |     |           | Established cell culture                                 | IZW             |
|               |     |           | Established cell culture                                 | FLI             |
|               |     |           | Cryopreserved tissue                                     | OP              |
|               |     |           | iPSCs (Published, 2011 <sup>e</sup> )                    | SDZSP/TSRI      |

SDZSP, San Diego Zoo Safari Park, USA; IZW, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany; Dvur, ZOO Dvůr Králové, Czech Republic; OP, Ol Pejeta Conservancy, Kenya; FLI, Friedrich Loeffler Institute on the Isle of Riems, Germany; MDC, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany; HCM, Helmholtz Center Munich, Germany; TSRI, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA.

<sup>a</sup>Frozen semen of very poor quality. Not suitable for AI.

<sup>b</sup>Tissue quality is not known due to questionable cryoprotective agent.

<sup>c</sup>Tissue quality is not known since samples were collected about 36 hr after the animal died.

<sup>d</sup>Frozen spermatozoa are immotile so cannot be used for AI.

<sup>e</sup>Friedrich Ben-Nun et al. [2011].

Bijlage 1. Deze tabel geeft een overzicht van het sperma en celmateriaal dat men bezit van de Noordelijke witte neushoorn. De gegevens zijn niet zeer recent. De mannelijk Noordelijke witte neushoorn Sudan is sinds de aanmaak van deze tabel overleden.