

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Elefanten

Im Zeitraum von 1995 bis 2005 wurden die Trächtigkeiten von 9 Afrikanischen (*Loxodonta africana*) und 10 Asiatischen (*Elephas maximus*) (E1-19) Elefanten mit bekannten Ovulationszeitpunkt mittels Ultraschall überwacht. Das Alter der Trächtigkeit bzw. das fötale Alter konnte daher jederzeit berechnet werden. Die Elefanten wurden sowohl in protected contact als auch in free contact Systemen gehalten. Im free contact System war ein direkter Kontakt zu den Tieren möglich. Durch vorbereitendes Training der Elefanten konnte auf jedwede Zwangsmaßnahmen oder medikamentöse Sedation verzichtet werden. Das Training beinhaltete die Gewöhnung an rektale Spülungen und das Abliegen in linke und rechte Seitenlage. Die Ultraschalluntersuchungen fanden immer in für die Elefanten gewohnter Umgebung im Beisein der Pfleger statt. Die Anwesenheit dieser Personen war sowohl für die Kooperation des Elefanten wie auch für die Sicherheit des Untersuchenden unerlässlich. Während der Untersuchung wurden die Tiere meist mit Früchten oder Brot gefüttert, um die Prozedur mit einem positiven Erlebnis zu verbinden (positive reinforcement). Die genaue Anzahl der Ultraschalluntersuchungen pro Tier und das fötale Alter zum Untersuchungszeitpunkt sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Die Elefanten E2, E4, E5, E6, E8, E9, E11, E13, E15 und E16 wurden von Dr. Thomas Hildebrandt, Dr. Frank Göritz und Dr. Robert

Hermes untersucht. Dr. Dennis Schmitt untersuchte die Elefanten E1, E3, E7, E10 und E14. Die Aufnahmen der Ultraschalluntersuchungen wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, zusammen mit Dr. Thomas Hildebrandt, Dr. Frank Göritz und DVM Peter Rich die Elefanten E12, E17, E18 und E19 untersucht.

ID	Art	ZB Nr.	Name	Institution	Ovulation Datum		Anzahl Unters.	Alter [Tage]	US - Technik
E1	Em	299	Becky	Have Trunk, Perris, CA	13.01.04	NB	1	69	2D
E2	Em	9007	Yashoda	TPK Carl Hagenbeck, Hamburg, D	22.01.99	NB	1	189	2D
E3	Em	288	Tess	Have Trunk, Perris, CA	19.08.03	KB	1	216	2D
E4	Em	8715	Kwanchai	Jerusalem Zoo, Jerusalem, IRL	19.03.04	KB	1	133	2D
E5	La	143	Kubwa	Indianapolis Zoo, Indianapolis, USA	30.01.04	NB	1	122	2D
E6	La	8604	Tonga	Tierpark Schönbrunn, Wien, A	13.08.01	KB	1	129	2D
E7	La	389	Misha	Marine World, Vallejo, USA	23.05.01	NB	2	150	2D
E8	La	92	Robin	Disney's Animal Kingdom, USA	16.06.01	KB	1	68	2D
E9	La	205	Moyo	Disney's Animal Kingdom, USA	23.08.01	KB	1	132	2D
E10	La	371	Tika	Marine World, Vallejo, USA	03.12.00	KB	2	88 - 172	2D
E11	Em	165	Shanti	NZP, Washington, USA	22.02.02	KB	3	97 - 158	2D
E12	Em	8212	Kaylee	Whipsnade, Dunstable, GB	15.04.04	NB	3	79 - 189	2D
E13	Em	359	Phoebe	African Lion Safari, Cambridge, USA	19.01.98	NB	3	76 - 130	2D
E14	La	165	Tonga	Riddle's Sanctuary, Greenbier, USA	16.04.00	NB	3	69 - 110	2D
E15	Em	8405	Azizah	Whipsnade, Dunstable, GB	18.12.202	NB	4	64 - 163	2D
E16	La	8501	Sabi	Tierpark Schönbrunn, Wien, A	23.07.99	KB	6	60 - 240	2D, 3D
E17	Em	356	Natasha	African Lion Safari, Cambridge, Ca	13.02.04	NB	14	80 - 234	2D, 3D
E18	Em	264	Kitty	African Lion Safari, Cambridge, Ca	10.07.04	NB	35	85 - 226	2D, 3D
E19	Em	347	Lily	African Lion Safari, Cambridge, Ca	25.08.04	NB	56	47 - 201	2D, 3D

Tabelle 2.1: Sonographisch untersuchte Elefanten (E1-19). La - *Loxodonta africana* (Afrikanischer Elefant), Em - *Elephas maximus* (Asiatischer Elefant), ZB - Zuchtbuch, KB - künstliche Besamung, NB - natürlicher Deckakt

2.2 Definition des Ovulationszeitpunkts

In die Untersuchungen wurden ausschliesslich Elefanten mit bekanntem Ovulationszeitpunkt einbezogen. Der Tag der Ovulation wurde folgendermassen definiert: im Rahmen eines Programmes zur künstlichen Befruchtung (KB) wurden täglich die Hormonspiegel von 5α -DHP und LH im Blutserum bestimmt. Drei Wochen nach Feststellung des ersten, anovulatorischen LH - peaks war der zweite, ovulatorische LH - peak zu erwarten. Zusätzlich zur Hormonüberwachung wurden in diesem Zeitraum tägliche transrektale Ultraschalluntersuchungen zur Darstellung morphologischer Veränderungen im Genitaltrakt einschließlich der Ovarien durchgeführt. Zehn Tage vor dem ovulatorischen LH - peak wurde die kontinuierliche Reifung des dominanten Follikels zum Graaf'schen Follikel beobachtet. Sonographisch konnte nachgewiesen werden, dass der führende Follikel ca. 6 bis 12 Stunden nach der Erhöhung des LH - Spiegels im peripheren Blut ovuliert (Hildebrandt et al, in press). Der Tag, an welchem der führende Graaf'sche Follikel infolge seiner Ruptur nicht mehr sonographisch darstellbar war, zusammen mit der Detektion des zweiten, ovulatorischen LH - peaks, wurde als Ovulationszeitpunkt definiert. Die künstliche Besamung erfolgte am Tag der Ovulation und am darauffolgenden Tag. Auch im Falle einer natürlichen Befruchtung (NB) durch einen Elefantenbullen bildeten tägliche Hormonmessungen im Blutserum (5α -DHP und LH) die Grundlage für die Bestimmung des Ovulationszeitpunktes. Einige Tage vor dem erwarteten zweiten LH - peaks wurde der Bulle zur Elefantenkuh gelassen. Die Tiere standen dabei unter ständiger Beobachtung. Die Messung des zweiten LH - peaks und beobachtete Deckakte wurden als Tag der Ovulation definiert.

2.3 Ultraschalluntersuchung

Um für die akustische Ankopplung störende Kotballen zu entfernen, erfolgte vor der eigentlichen Untersuchung eine Spülung des Rektums mit lauwarmem Leitungswasser (Abb. 2.1(a)). Hierzu wurde das Ende eines Gummischlauchs mit Ultraschallgel präpariert um diesen manuell mit möglichst geringem Widerstand in das Rektum einführen zu können. Durch das



(a) Vorbereitung auf die Ultraschalluntersuchung: Spülung des Rektums mit warmem Leitungswasser



(b) Trächtigkeitsuntersuchung mit 3D-Ultraschall (Voluson 530)

Abbildung 2.1: Ultraschalluntersuchung

Wasser liessen sich die festen Kotballen erweichen und ausspülen. Ein zusätzlicher Effekt des warmen Wassers bestand in der Relaxierung der Darmmuskulatur, was die anschließende Untersuchung erleichterte. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte vorzugsweise in Seitenlage des Elefanten. Sobald sich der Elefant abgelegt hatte, wurde das Rektum nochmals auf die oben beschriebene Weise von eventuell nachgeschobenen Kotballen befreit.

Für die Durchführung einer Untersuchung waren immer mehrere Personen notwendig: während die Pfleger den Elefanten beaufsichtigten führte ein Tierarzt die Sonde und eine weitere Person nahm notwendige Einstellungen am Ultraschallgerät vor (Abb. 2.1(b)). Um ein leichtes Einführen der Ultraschallsonde in das Rektum zu gewährleisten, wurde sowohl auf Hand und Arm des Untersuchers als auch auf die Sonde Ultraschallgel aufgetragen. Das Ultraschallgel sorgte zudem für eine gute akustische Ankopplung an die Darmwand.

Um sich eine Übersicht über die anatomischen Gegebenheiten zu verschaffen, wurde der Urogenitaltrakt von kaudal nach kranial systematisch sonographisch dargestellt. Die erste

prominente Struktur war das Vestibulum, gefolgt von der Urethra und der auf dem Beckenboden liegenden Harnblase mit den einmündenden Ureteren. Der Eingang in die Vagina konnte dorsal der urethralen Mündung in die Harnblase dargestellt werden. Die Vagina selbst erschien als keilförmiges Gebilde, welches bei trächtigen Tieren immer mit anechogenem Schleim gefüllt war. Nach der kurzen Zervix gelangte man an den Uteruskörper und die anschliessenden Uterushörner, die erst noch parallel, dann getrennt nach kranial zogen. Die Sonde wurde dann entlang der Uterushörner geführt, bis der sich im Uteruslumen befindliche Konzeptus gezeigt werden konnte.

Je nach Alter der Trächtigkeit wurden nun die Fruchtblase, der Embryo beziehungsweise Fötus, die extraembryonalen Organe wie Dottersack und Allantois und die Plazenta sonographisch dargestellt. Im Real - time - Mode konnten auch Bewegungstudien des Embryos bzw. Fötus durchgeführt werden. Weiterhin wurden darauf geachtet, dass möglichst alle wichtigen biometrischen Parameter wie Scheitel-Steiss-Länge (SSL), Biparietaler Abstand (BPA), Femurlänge (FL) und Thoraxdurchmesser (TH) für retrospektive Messungen in ihrer maximalen Ausdehnung gezeigt wurden. Der fötale Kreislauf einschliesslich der Allantoisgefässe wurden mittels Colour Doppler Flow charakterisiert. Alle Aufnahmen wurden während der Untersuchung auf Videoband aufgezeichnet. Im Falle einer 3D - Sonographie wurde die Sonde nach Auffinden des Konzeptus auf Volume-Mode umgestellt. Während die Hand des Untersuchers möglichst ruhig blieb, wurde der Schallkopf durch einen internen Schwenkmechanismus über das ausgewählte Objekt geführt (Abb. 1.4). Das so gescannte Volumen wurde anschliessend auf dem Monitor des Ultraschallgerätes beurteilt und je nach Qualität verworfen oder auf der gerätsinternen Festplatte zwischengespeichert.

Durch die variable Lage der Uterushörner nahm das Auffinden des Konzeptus unterschiedlich viel Zeit in Anspruch. Oft behinderten Darmschlingen sowohl die freie Sicht auf wichtige Strukturen als auch die Beweglichkeit des Arms des Untersuchers. Auch nachschiebender Kot oder eine Konstriktion der Darmmuskulatur konnten die Untersuchung erschweren. In letzterem Fall hat es sich als hilfreich erwiesen, Kotballen durch erneutes Spülen mit warmen Wasser zu entfernen und mittels leichter rektaler Massage die Muskulatur zu ent-

spannen. War der Konzeptus nun immer noch nicht darstellbar, ließen die zuständigen Pfleger die Elefantenkuh aufstehen und führten sie einige Minuten umher. Störende Darmschlingen verlagerten sich dadurch oft so, dass der Konzeptus bei erneuter Seitenlage des Elefants nun darstellbar war. Ein Wechsel von linker in rechte Seitenlage und umgekehrt zeigte einen ähnlichen Effekt. Eine Ultraschalluntersuchung dauerte zwischen 15 und 70 Minuten.

2.4 Ultraschallgeräte

Da sich die Ultraschalluntersuchungen über einen langen Zeitraum hinweg erstreckten, wurden aufgrund technischer Neuerungen verschiedene Systeme eingesetzt. Das erste Gerät, das verwendet wurde, war ein portabler Real Time B-Mode Scanner (EUB 459, Hitachi Medical Corporation, Japan) ausgerüstet mit einer 3,5 MHz Konvexsonde. Später kam ein wesentlich kleineres und handlicheres Ultraschallgerät zum Einsatz, ebenfalls ein portabler Real Time B-Mode Scanner (Sonosite 180Plus, Sonosite Inc., USA). Die zugehörige Konvexsonde war dynamisch fokussierbar und besaß einen Frequenzbereich von 10,0 bis 3,5 MHz. Die 3D - Sonographie wurde mit ursprünglich stationären Geräten (Voluson 530 und Voluson 730, GE Medical Systems, USA), ausgestattet mit einer speziellen konvexen 3D-Sonde (7,0 - 4,0 MHz), durchgeführt. Für die Anwendung am Elefanten war es jedoch wichtig, dass das Gerät in der Stallung bewegt werden konnte. Sobald sich der Elefant in Seitenlage befand musste das Ultraschallgerät möglichst nahe am Tier stehen, damit der Untersucher noch freien Blick auf den Monitor hatte. Eine weitere Einschränkung war das relativ kurze Sondenkabel, welches den Transducer mit dem Gerät verband. Um trotzdem gute Aufnahmebedingungen zu schaffen, wurde ein spezieller Untersatz mit Rollen für das Ultraschallgerät konstruiert. Dies hatte den zusätzlichen Vorteil, dass die teure Maschine nicht direkt mit dem nassen Untergrund in Berührung kam und nach der Untersuchung in einem separaten Raum abgestellt werden konnte.

2.5 Dokumentation

Alle Real - Time - B - Mode - Ultraschalluntersuchungen wurden mit Videorecorder (Watchman GV - D1000E PAL MiniDV, Sony, USA) auf Band lückenlos aufgezeichnet. Die Volumenscans des Voluson 530 wurden während der Untersuchung auf der geräteinternen Festplatte zwischengespeichert und im Anschluß auf magneto - optical - discs (MOD) gesichert. Die Volumendatensätze konnten dann wiederum über den Parallelport eines externen MOD - Laufwerks auf einen Computer übertragen werden. Die nächste Generation des 3D - Ultraschallsystems, der Voluson 730, verfügte bereits über einen internen CD-Brenner, so dass sich die Datensicherung und -übertragung hier einfacher gestaltete.

2.6 Retrospektive Datenanalyse

Für die retrospektive Bildanalyse wurde das gesamte Videomaterial nochmals mit einem Videorecorder gesichtet. Nach sorgfältiger Betrachtung wurden wichtige Videosequenzen digitalisiert, aus welchen dann charakteristische Sonogramme erstellt und im JPEG-Format abgespeichert wurden (Adobe[®] Premiere Pro 1.5, Adobe Systems Inc., USA). Bei der Erstellung von Ultraschallbildern für die Messung biometrischer Parameter wurde darauf geachtet, dass ein für den jeweiligen Parameter optimales Einzelbild aus der entsprechenden Videosequenz ausgewählt wurde. Für die eigentliche Messung war es notwendig, die Sonogramme mit Hilfe eines speziellen Softwareprogramms (analySIS[®] GmbH, Deutschland) abhängig von der verwendeten Frequenz zu kalibrieren. Nach erfolgter Kalibrierung und Messung wurden die Sonogramme mit Messlinie und Messwert nochmals abgespeichert.

Die Volumendatensätze wurden entweder am Ultraschallgerät direkt oder am Computer mit spezieller Software (4D View, GE Medical Systems Kretztechnik GmbH & Co OHG, Österreich) in verschiedenen Modi dargestellt.

Im Multiplanar Mode wurden gleichzeitig drei zueinander senkrechte Ebenen dargestellt, die anhand der Referenzebene in x- und y-Richtung verschoben sowie um ihren gemeinsa-

men Schnittpunkt gedreht werden konnten. Die beliebige Auswahl der Ebenen innerhalb des Volumendatensatzes ermöglichte die Einstellung ausgewählter Strukturen in ihrer maximalen Ausdehnung und die Charakterisierung ihrer anatomischen Lage. Der Multiplanar Mode bewährte sich besonders in der Beurteilung und Zuordnung der extraembryonalen Organe. Jede gewählte Ebene konnte im Vollbildmodus dargestellt und im BMP-Format abgespeichert werden. In einem weiteren Untermenü erfolgte die Messung der zuvor möglichst optimal eingestellten biometrischen Parameter. Da die Software eigens auf das Ultraschallgerät abgestimmt war, musste keine Kalibrierung mehr vorgenommen werden. Das Bild mit eingetragener Messlinie und Messwert wurde erneut zur vollständigen Dokumentation abgespeichert.

Der Render Modus ermöglichte die Charakterisierung von Oberflächenstrukturen. Das ausgewählte Objekt konnte hier in einer sog. Render Box definiert und scheinbar dreidimensional rekonstruiert werden. In einem Untermenü konnten überflüssige oder störende Strukturen, wie beispielsweise Rekonstruktionen des Endometriums, welche die freie Sicht auf embryonale Strukturen behinderten, ausgeschnitten werden. Der originale Volumendatensatz wurde dadurch nicht verändert. Die so berechneten Bilder konnten ebenfalls im BMP-Format abgespeichert werden.

2.7 Biometrische Parameter

Es wurden folgende biometrische Parameter erhoben: Scheitel-Steiss-Länge (SSL), Biparietaler Abstand (BPA), Thoraxdurchmesser (TH) und Femurlänge (FL).

In sehr frühen Stadien wurde die Scheitel-Steiß-Länge als maximale Länge des Embryos definiert (Abb. 2.2(a)). Später, als Kopf und Rumpf schon differenzierbar waren, erfolgte die Messung vorzugsweise in lateraler Position des Fötus vom Scheitel bis zum Schwanzansatz (Abb. 2.2(b)).

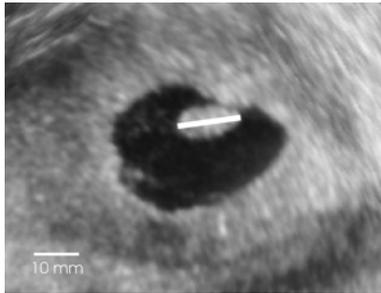
Konnte eine laterale Ansicht nicht erzielt werden, wurde die Scheitel-Steiss-Länge in horizontaler Ebene gemessen (Abb. 2.3(a)). Mit der fortschreitenden Trächtigkeit nahm auch

das Größenwachstum rapide zu, so dass der Fötus in seiner Gesamtheit nicht mehr im Ultraschallfenster dargestellt werden konnte. Um dennoch eine Messung zu erhalten, wurde die Länge vom Scheitel bis zum Sternum zur Länge des restlichen Rumpfes bis zum Schwanzansatz addiert.

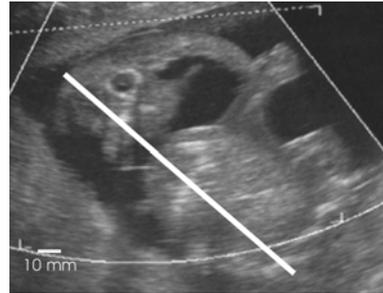
Als biparietaler Durchmesser wurde in jüngeren Stadien der größte Kopfdurchmesser gemessen. Nach stattgefundener Verknöcherung erfolgte die Messung in sagittaler Ebene vom äusseren Rand des parietalen Knochens der einen Seite zum äusseren Rand des parietalen Knochens der anderen Seite (Abb. 2.3(b)).

Der Thoraxdurchmesser (Abb. 2.4(b)) wurde als maximaler Durchmesser des Rippenbogens in sagittaler Ebene definiert.

Die Femurlänge bezieht sich auf die maximale Diaphysenlänge des Knochens (Abb. 2.4(a)).

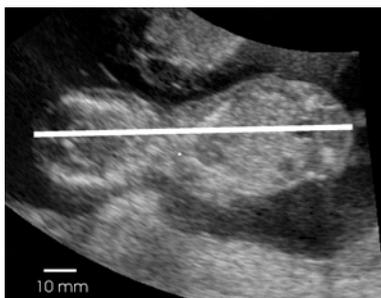


(a) In jüngeren Stadien entspricht die maximale Länge des Embryos (hier Tag 74) der SSL

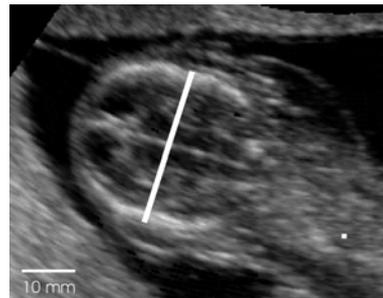


(b) Messung des SSL in lateraler Position (Tag 134)

Abbildung 2.2: Messung biometrischer Parameter: SSL



(a) Messung der SSL in horizontalen Position (Tag 133) der SSL



(b) Messung des BPA (Tag 133)

Abbildung 2.3: Messung biometrischer Parameter: SSL, BPA

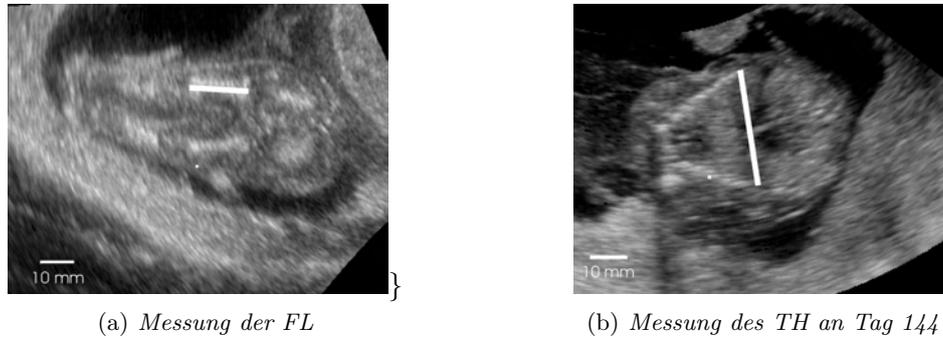


Abbildung 2.4: Messung biometrischer Parameter: FL, TH

2.8 Formalinfixierte Elefantenföten

Im Jahr 1997 untersuchten Dr. Hildebrandt und Dr. Göritz im Museum des Krüger Nationalparks sechs formalinfixierte Elefantenföten (WB1-6) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Abb. 2.5). Die Föten wurden photographiert, gewogen und vermessen. Anschließend erfolgte eine sonographische Untersuchung (EUB 459, Hitachi Medical Corporation, Japan) im Wasserbad. Die Ultraschalluntersuchung wurde auf Videoband aufgezeichnet und stand für die vorliegende Arbeit zur retrospektiven Analyse zur Verfügung. Zur Messung der SSL wurden hierbei wie bereits beschrieben erst Standbilder generiert (Adobe[®] Premiere Pro 1.5, Adobe Systems Incorporated, USA), welche anschliessend mit spezieller Software frequenzabhängig kalibriert und vermessen wurden (analySIS[®], Soft Imaging System GmbH, Deutschland).

2.9 Abortierte Elefantenföten

In verschiedenen Institutionen kam es zu Aborten von Asiatischen Elefantenföten. Die Föten (A1-3) wurden gewogen und ihre Scheitel - Steiss - Länge wurde per Lineal bestimmt. Das Alter der abortierten Föten ist anhand des beobachteten Deckakts in Verbindung mit Hormonbestimmungen bekannt. Die Daten sind in Tab. 2.2 aufgeführt.



Abbildung 2.5: Formalinfixierte Föten WB1-6

ID	Spezies	SSL [mm]	Masse [kg]	Alter [Tage]
A1	Em	550	19	336
A2	Em	700	24	420
A3	Em	900	68	530

Tabelle 2.2: Daten der abortierten Föten (A1-3)

2.10 Statistik

Um das Verhältnis zwischen fötalem Alter und BPD, TH und FL zu bestimmen, wurden lineare Regressionsanalysen vorgenommen. Das Verhältnis zwischen fötalem Alter und SSL wurde durch nichtlineare Regression bestimmt. Die Regressionslinien zwischen dem fötalen Alter und verschiedenen morphologischen Parametern (Scheitel-Steiss-Länge, Biparietaler Abstand, Thoraxdurchmesser und Femurlänge) wurden mittels Kovarianzanalyse auf Unterschiede zwischen Asiatischen und Afrikanischen Elefanten getestet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der Software SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die Anpassung der Wachstumsmodelle nach Gompertz und von Bertalanffy an die SSL - Messungen der Elefanten wurden mit Maple 10 (Waterloo Maple Inc., Canada) und SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.