

Abschlussbericht Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen (HES 7-14)

Förderkennzeichen: 2821HS005
Geschäftszeichen: 323-06.01-2821HS005
Laufzeit: 15. Juni 2021 - 31. März 2023
Berichtszeitraum: 15. Juni 2021 - 31. März 2023

**Projektleitung und
Ansprechpartnerin:**

Prof. Dr. med. vet. habil. Christine Baumgartner

Zentrum für Präklinische Forschung
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Ismaninger Straße 22
81675 München
Tel. 089 - 4140 4472
Christine.Baumgartner@tum.de

Institution

- **Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF)**
Klinikum rechts der Isar
Medizinische Fakultät der Technischen Universität München
Ismaninger Straße 22
81675 München

Projektleitung und Ansprechpartnerin:

Prof. Dr. med. vet. Christine Baumgartner

Studienmitarbeiter:innen

PostDocs:

Dr. med. vet. Anna Saller
Dr. med. vet. Julia Werner

Doktorandinnen:

Stephanie Süß
Larissa Weiss

Kooperationspartner:innen

- **Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin**
Klinikum rechts der Isar
Medizinische Fakultät der Technischen Universität München

Gruppenleiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Thomas Fenzl

Studienmitarbeiter:innen

Ph.D. Malte Anders
M. Sc. Sandra Kollmansperger

- **Professur für Biotechnologie der Reproduktion**
TUM School of Life Sciences

Gruppenleiter: Prof. Dr. med. vet. Benjamin Schusser

Studienmitarbeiter:innen

Dr. Hicham Sid

Weitere Kooperationspartner:innen:

- Die Datenanalyse mittels DeepLabCut erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Janie M. Ondracek, Lehrstuhl für Zoologie, Technische Universität München.
- Die statistische Auswertung wurde mit Unterstützung von Ph.D. Yury Zablotzki, Medizinische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.
- Die Analyse der neurohumoralen Parameter erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Bavarian Center for Biomolecular Mass Spectrometry (BayBioMS), Technische Universität München.

Wissenschaftlicher Beirat der Studie

- Prof. Dr. Dr. Michael Erhard (Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung, Tierärztliche Fakultät, LMU München)
- Prof. Dr. Wolf Erhardt (Zentrum für Präklinische Forschung, TU München, emeritiert)
- Prof. Dr. Harald Luksch (Lehrstuhl für Zoologie, TUM School of Life Sciences, TU München)
- Prof. Dr. Heidrun Potschka (Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Fakultät, LMU München)
- Prof. Dr. Hans Straka † (Division of Neurobiology, Department Biology II, LMU München)
- Dr. Britta Wirrer (Sachgebiet 54 – Tierschutz, Regierung von Oberbayern)

Inhalt

1.	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	3
1.1.	Planung und Ablauf des Vorhabens	3
1.2.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
2.	Material und Methoden.....	8
2.1.	Versuchstiere	8
2.2.	Vorstudien.....	8
2.2.1.	Etablierung Versuchssetup.....	8
2.2.2.	Etablierung Messparameter	9
2.2.3.	Etablierung noxischer Stimulus	11
2.3.	Hauptstudie.....	12
2.3.1.	Vorbereitung der Hühnerembryonen	12
2.3.2.	Kardiovaskuläre Parameter	13
2.3.3.	Verhaltensparameter.....	15
2.3.4.	Elektrophysiologische Parameter	19
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	24
3.1.1.	Vorstudien.....	24
3.1.1.1.	Etablierung Versuchssetup.....	24
3.1.1.2.	Etablierung Messparameter	24
3.1.1.3.	Etablierung noxischer Stimulus	25
3.1.2.	Hauptstudie.....	26
3.1.2.1.	Kardiovaskuläre Parameter.....	26
3.1.2.2.	Verhaltensparameter.....	43
3.1.2.3.	Elektrophysiologische Parameter	54
4.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	60
5.	Zusammenfassung.....	62
6.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen.....	65
7.	Literaturverzeichnis	67
8.	Anhang.....	71
8.1.	Abbildungsverzeichnis.....	71
8.2.	Tabellenverzeichnis.....	72

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens

Ziel des Forschungsvorhabens „Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen (HES 7-14)“ war die Bestimmung des Zeitraumes, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln bzw. die Fähigkeit entwickeln, aversive Sinneserlebnisse als Schmerzen zu empfinden. Dazu wurden unter standardisierten Laborbedingungen die Reaktionen von Hühnerembryonen auf noxische (tatsächlich oder potentiell gewebschädigende) Reize gemessen. Als Bewertungsgrundlage dienten objektive klinische Parameter und Laborparameter, um den Zeitraum der einsetzenden Nozizeption bzw. des Schmerzempfindens von Hühnerembryonen genauer eingrenzen zu können.

Das Projekt soll als wissenschaftliche Entscheidungshilfe für das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft dienen. Die im Rahmen dieses Projekts gewonnenen Ergebnisse sollen eine Entscheidungsgrundlage liefern, inwiefern das „Gesetz zur Änderung des Tierschutzgesetzes – Verbot des Kükentötens“, welches ab dem 01.01.2024 ein Tötungsverbot von Hühnerembryonen nach dem sechsten Bebrütungstag im Rahmen der Geschlechtsbestimmung vorsieht, evtl. geändert werden kann.

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde das Projekt in drei Abschnitte, die Vorstudie Teil 1 und Teil 2 sowie die Hauptstudie, gegliedert (Abbildung 1).

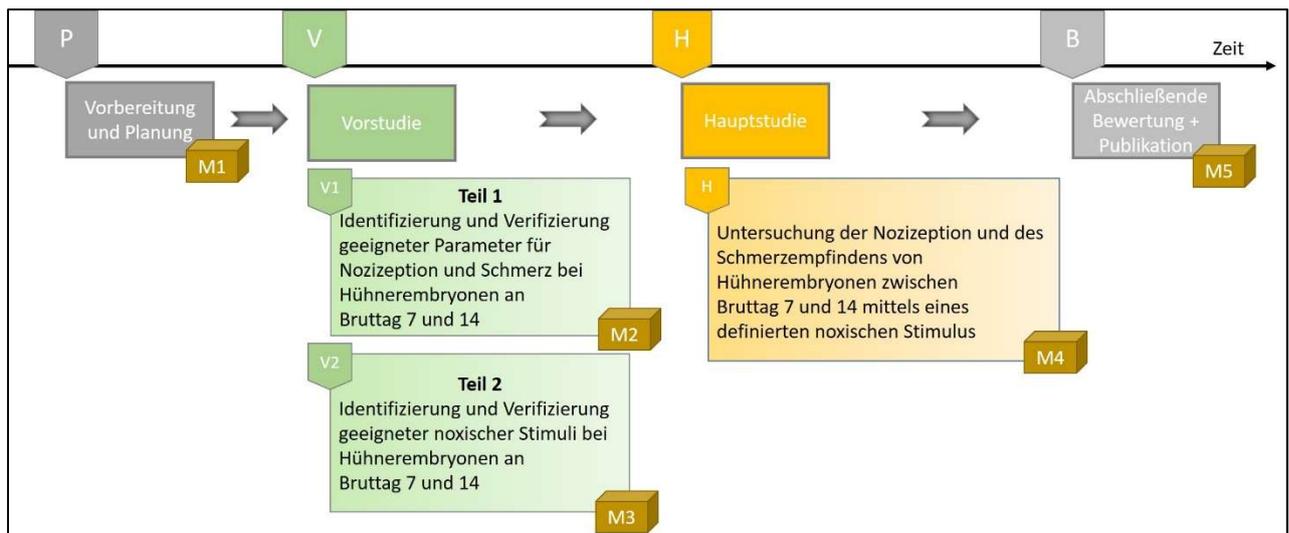


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Studienabschnitte und Meilensteine.

Vorbereitungs- und Planungsphase

Die ersten drei Monate des Projekts wurden zur Vorbereitung der In-vivo-Versuche und zur Etablierung der Prozessabläufe genutzt. Es erfolgten Exkursionen an die Versuchsstation Thalhausen des TUM Animal Research Center sowie an die Professur für Biotechnologie der Reproduktion der TUM School of Life Sciences in Weihenstephan zur Schulung der Mitarbeiter:innen in der Arbeit mit Hühnerembryonen.

Vorstudie Teil 1

Die Vorstudie Teil 1 diente der Identifizierung und Verifizierung geeigneter Parameter zur Messung nozizeptiver bzw. schmerzassoziierter Reaktionen im Hühnerembryo. Zunächst wurde ein geeignetes Versuchssetup etabliert, in das die verschiedenen Messsysteme für die entsprechenden Parameter integriert wurden. Klinische (Blutdruck, Herzfrequenz, Verhalten), elektrophysiologische (EEG) und labordiagnostische (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin) Parameter wurden in das Versuchssetup Hühnerembryo integriert und an die jeweiligen Bruttage (Embryonic Days, ED) angepasst. Anschließend wurden Baselinemessungen durchgeführt und überprüft, ob zu den Entwicklungszeitpunkten eine Erhebung der Parameter möglich ist.

Vorstudie Teil 2

Im zweiten Teil der Vorstudie wurden geeignete Stimuli und Lokalisationen zur Induktion nozizeptiver bzw. schmerzassoziierter Reaktionen im Hühnerembryo getestet. Dazu wurden mechanische, thermische und elektrische Reize an verschiedenen Lokalisationen (Schnabelbasis, Nacken, Flügel, Bein) appliziert und hinsichtlich der Integration in das jeweilige Messsetup analysiert.

Auf Basis der Ergebnisse aus den Vorstudien erfolgte die Etablierung eines standardisierten Versuchsaufbaus für die Hauptstudie.

Hauptstudie

Ziel der Hauptstudie war es, mit Hilfe von hämodynamischen, labordiagnostischen und elektrophysiologischen Parametern sowie Verhaltensbeobachtungen, den Zeitpunkt, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln bzw. die Fähigkeit entwickeln, Schmerzen zu empfinden, zu bestimmen. Im Laufe der Studie wurde festgestellt, dass es notwendig ist, auch ältere Bruttage in die Untersuchungen mit einzuschließen, um Parameterveränderungen sicher als nozizeptive Reaktionen auf einen Stimulus interpretieren zu können. Aus diesem Grund wurde der vorher definierte Untersuchungszeitraum von ED7 bis ED14 auf ältere Bruttage (bis ED18 bzw. ED19) ausgeweitet. Es wurden alle Bruttage > ED14, bei denen die Etablierung der Messungen in das Versuchssetup möglich war, in die Hauptstudie

aufgenommen. Ziel war es, sich vom ältesten Bruttag, bei dem die Fähigkeit zur Nozizeption bzw. Schmerzen zu empfinden anzunehmen war, bis zum jüngsten Bruttag zurückzuarbeiten, um den Entwicklungszeitpunkt zu bestimmen, bis zu dem noch Veränderungen auf einen noxischen Reiz zu beobachten waren.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In der Schmerzforschung wird grundsätzlich die unbewusste Signalweiterleitung, die sogenannte *Nozizeption*, von der bewussten Wahrnehmung von *Schmerz* unterschieden. Während *Nozizeption* die Aufnahme von gewebeschädigenden (noxischen) Reizen und deren Weiterleitung durch das nozizeptive Nervensystem ist, zeichnet sich *Schmerz* durch eine subjektive, bewusste Sinnesempfindung, (meist) ausgelöst durch Nozizeption, aus. Das nozizeptive Nervensystem setzt sich aus den sensorischen Nervenfasern des peripheren Nervensystems, die über sogenannte Nozizeptoren potentiell schädigende Reize registrieren, und den Nervenzellen und -bahnen des zentralen Nervensystems zusammen. Erst durch die subjektive, bewusste Wahrnehmung der Nozizeption entsteht Schmerz, der durch äußere Faktoren wie Stress oder Angst zusätzlich verstärkt werden kann (Henke et al., 2012). Voraussetzung für die Fähigkeit, Schmerzen zu empfinden, ist also neben einem funktionsfähigen Nervensystem, welches in der Lage ist, noxische Reize zu erkennen und weiterzuleiten, ein funktionsfähiges Gehirn, das in der Lage ist, die Reize adäquat zu verarbeiten (Mellor & Diesch, 2006).

Die Entwicklung des Hühnerembryos und dessen Nervensystems ist ein stufenweiser Prozess, der im Laufe der 21 Tage langen Bebrütungsdauer voranschreitet. Ab dem 4. Bebrütungstag sind spontane Bewegungen des Embryos möglich und erste elektrische Signale im Rückenmark messbar (Freeman & Vince, 1974). Mehrere Publikationen stimmen dahingehend überein, dass ein Schmerzempfinden im ersten Trimester der Embryonalentwicklung nicht möglich ist. Begründet wird diese Annahme damit, dass das Nervensystem des Hühnerembryos zu diesem Zeitpunkt noch zu unreif ist, um eine Perzeption von Schmerz zu ermöglichen. Bis zum Bebrütungstag 6,5 zeigt das Gehirn keine elektrische Aktivität (Peters et al., 1956). Die ersten sensorischen afferenten Nervenfasern entwickeln sich ab dem 4. Bebrütungstag, allerdings kommt es erst am 7. Bebrütungstag zum Schluss von multisynaptischen Reflexbögen (Eide & Glover, 1995; Mellor & Diesch, 2007; Rosenbruch, 1997). Rosenbruch (1997) nimmt sogar an, dass bis zum 10. Tag nur von einer eingeschränkten Empfindung des Hühnerembryos auszugehen ist. In einer Publikation von Chumak et al. (1961) wurden reflektorische Reaktionen des Hühnerembryos auf Schmerz und andere thermische und sensorische Reize untersucht. Ab dem 7. Inkubationstag konnte hier eine funktionelle Verbindung der Nozizeptoren bestimmter

Hautareale mit reflektorischen Bögen der Bewegungsreaktionen des Hühnerembryos nachgewiesen werden (Chumak, 1961). Am 7. Bruttag konnten spezifische Reaktionen in Form von dorsaler und lateraler Flexion des Kopfes auf Nadelstiche im Schnabelbereich beobachtet werden (Chumak, 1961). Im weiteren Verlauf der Entwicklung (8. Tag) vergrößern sich die sensiblen Bereiche in craniocaudaler Richtung und erstrecken sich bis zum Hals, Unterarm und Mittelfuß. Mellor und Diesch (2007) hingegen sind der Meinung, dass Bewegungen der Körper- und Gliedmaßen erst ab dem 13. Inkubationstag durch spinale und/oder subkortikale neuronale Strukturen gesteuert werden. Die Einbindung von Geruchsrezeptoren und des Vestibulär-, Hör- und Sehapparates in reflektorische Handlungen erfolgt im letzten Viertel des Zeitraums der Embryonalentwicklung (Chumak, 1961). Weitere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass der Hühnerembryo erst ab dem 13. Bruttag ein funktionales Gehirn besitzt (Bjørnstad et al., 2015 AVMA, 2020).

Dass Säugetiere und Vögel die Fähigkeit zu Nozizeption und Schmerzempfinden besitzen, gilt als wissenschaftlich gesichert (Gentle, 1992; Gentle, 2011; Smith & Lewin, 2009). Die Empfindung von Schmerz setzt die zentrale Weiterverarbeitung eines noxischen Reizes und dessen Wahrnehmung voraus. In Säugetieren erfolgt die zentrale Reizverarbeitung letztendlich im Cortex cerebri. Vögel besitzen diesen nicht, aber sie haben ein Pallium, das funktional dem Cortex cerebri der Säuger sehr ähnlich ist und vermutlich die gleichen Aufgaben übernimmt (Güntürkün et al., 2021; Stacho et al., 2020). Es wird folglich davon ausgegangen, dass die Verarbeitung noxischer Stimuli ähnlich abläuft wie bei Säugetieren (Douglas et al., 2018). Die Aufzeichnung eines Elektroenzephalogramms (EEG) gibt dabei Hinweise auf die Aktivierung und Funktionalität des Gehirns bzw. einer Gehirnregion. Änderungen neuronaler Aktivitätsmuster im epiduralen EEG weisen auf einen noxischen Reiz hin und ob eine Weiterleitung der noxischen Signale in primäre und sekundäre Gehirnregionen und deren Weiterverarbeitung stattfindet. Ab welchem Entwicklungszeitpunkt sich Änderungen der neuronalen Aktivitätsmuster von Hühnerembryonen durch noxische Reize ergeben, wurde bislang noch nicht untersucht. Jedoch wurden bereits Studien durchgeführt, ab wann sich Spontanaktivität im Gehirn von Hühnerembryonen nachweisen lässt. Neuronale Spontanaktivität einzelner Gehirnregionen ist indikativ für deren Ausreifung und Funktionalität und damit die Voraussetzung für Schmerzwahrnehmung. Peters et al. (1960) fanden bis zum 11. Tag keinerlei spontane elektrische Aktivität, ab dem 13. Tag der Bebrütung wurde in der Ableitung des Palliums beginnende Spontanaktivität detektiert, ab Tag 15 zeigten auch die anderen Gehirnregionen zunehmend spontane elektrische Aktivität. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Katori (1962), der erste neuronale Aktivitäten in visuellen Arealen des Palliums ab Tag 12 der Bebrütung feststellte. Garcia-Austt (1954) stellte sporadische spontane elektrische Aktivität im Gehirn des Hühnerembryos ab dem 13. Bebrütungstag fest.

Im Hinblick auf die Verwendung von Hühnerembryonen in der Versuchstierkunde wird aufgrund der bisherigen Datenlage u. a. von Aleksandrowicz und Herr (2015) gefordert, dass schmerzhaftes Eingriffe an Hühnerembryonen, die älter als 7 Tage sind, und besonders bei Embryonen ab dem 13. Bruttag, unter angemessener Anästhesie erfolgen müssen. Diese Forderung wird durch die Tatsache untermauert, dass invasive Stimuli, auch die, die vor Einsetzen eines Schmerzempfindens erfolgen, die Sensitivität eines Individuums für Schmerz und Leiden erhöhen können (Mellor et al., 2009). Auch die Entwicklung von geeigneten Anästhesie- und Analgesieprotokollen diesbezüglich ist derzeit Bestandteil der Forschung (Horr et al., 2023). Nach neuesten Erkenntnissen wird mittlerweile bei der Euthanasie von Hühnerembryonen empfohlen, nach 50 % bzw. spätestens nach 80 % der Entwicklungszeit die gleichen Methoden wie bei adulten Tieren anzuwenden, um ein mögliches Leiden der Embryonen zu minimieren (ACUC University of California, 2020; AVMA, 2020).

Die aktuelle Datenlage deutet darauf hin, dass Hühnerembryonen bereits *in ovo* die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln. Wie bereits angemerkt, zeigt die Literatur, dass Hühnerembryonen vor dem 7. Bruttag nicht zu Nozizeption oder Schmerzempfinden fähig sind. Darüber hinaus konnte allerdings bislang kein eindeutiger Zeitpunkt definiert werden, an dem die Fähigkeit zur Nozizeption und Schmerzempfinden einsetzt (Bjørnstad et al., 2015; Krautwald-Junghanns et al., 2018). Es muss erwähnt werden, dass viele der Studien zum Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen, auf denen diese Annahme beruht, im letzten Jahrhundert durchgeführt wurden. Der zwischenzeitliche Fortschritt in der Entwicklung von Messmethoden könnte hier neue Erkenntnisse ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Befruchtete Eier der Rasse Lohman Selected Leghorn wurden vom TUM Animal Research Center, Versuchsstation Thalhausen, bezogen. Die Eier wurden desinfiziert (Röhnfried Desinfektion Pro, Dr. Hesse Tierpharma GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Deutschland), beschriftet, gewogen und im Kühlschrank bei 15 °C für maximal eine Woche gelagert. Anschließend wurden die Bruteier in einen Inkubator (Favorit – Olymp 192 Spezial, HEKA Brutgeräte, Rietberg, Deutschland) überführt und bei 37,8 °C und 55 % Luftfeuchte bebrütet. Das Einlegen der Eier in den Inkubator erfolgte standardisiert um 08:30 Uhr. Die Entwicklungstage (Embryonic Days, EDs) wurden so definiert, dass der Tag des Einlegens als ED0 gezählt wurde. Bis ED3 wurden die Eier sechsmal am Tag gewendet und danach in einer horizontalen Position weiterbebrütet. Die Versuche wurden stets im Zeitraum zwischen 9:00 Uhr und 19:30 Uhr durchgeführt, sodass der Unterschied im Alter der Embryonen innerhalb eines Bruttags maximal 10,5 Stunden betrug.

Nach Versuchsende erfolgte die Euthanasie der Tiere durch die intravenöse Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, 16 g/100 ml, ED7 und ED9: 0,05 ml; ED12 bis ED15: 0,1 ml; ED16 bis ED18: 0,2 ml) und anschließende Dekapitation.

Die Bestimmung des Geschlechts der Hühnerembryonen erfolgte anschließend zwischen ED12 und ED19 durch makroskopische Untersuchung der Keimdrüsen. Bei Hühnerembryonen jünger als ED12 wurde Brustmuskulgewebe entnommen, die DNA isoliert und das Geschlecht mittels PCR bestimmt. Bei einem Teil der Embryonen wurde das Geschlecht nicht bestimmt.

2.2. Vorstudien

Im Rahmen der Vorstudien galt es, geeignete Parameter für die Messung nozizeptiver Reaktionen im Hühnerembryo in den verschiedenen Entwicklungsstadien zu identifizieren und in ein standardisiertes Versuchsssetup mit noxischem Stimulus zu etablieren.

2.2.1. Etablierung Versuchsssetup

Neben fenestrierten Hühnereiern (siehe 2.1 und 2.3) wurden in der Vorstudie auch sogenannte Surrogates als Versuchssystem überprüft.

Surrogates

Doppeldottereier (größere Hühnereier mit zwei Eidottern) wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 15 °C gelagert. Mit einem Diamantschleifer (DREMEL®3000, Robert Bosch Tool Cooperation, Racine, USA) wurden die Doppeldottereier fenestriert und entleert. Anschließend

wurden die bebrüteten Hühnerembryonen an ED3 in die leeren Doppeldotterschalen überführt. Zusätzlich wurden 0,5 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 units penicillin, 10 mg Streptomycin/ml, P4333-100 ml Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als Infektionsprophylaxe mit ins Ei gegeben. Die Öffnung im Ei wurde mit Frischhaltefolie versiegelt und die Surrogates bis zur finalen Verwendung im Brutschrank inkubiert.

2.2.2. Etablierung Messparameter

Kardiovaskuläre Parameter

Im Verlauf der Vorstudie Teil 1 wurden verschiedene Messsysteme zur Bestimmung kardiovaskulärer Parameter im Hühnerembryo getestet. 2D- (EPIQ 7, Philips, Amsterdam, Niederlande) und 4D-Ultraschallsysteme (Vevo 3100, FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada) ließen zwar eine Beurteilung der Herzfrequenz und der Flussrate zu, jedoch war die schlechte Zugänglichkeit des Embryos zur Stimulation, bedingt durch die relativ großen Ultraschallsonden, ein entscheidender Nachteil. Auch weitere Systeme wie ein lasergestütztes Doppler-Gerät (moorVMS-LDF, Moor Instruments, Axminster, Großbritannien) bzw. eine Laserkamera (moorFLPI-2, Moor Instruments, Axminster, Großbritannien) zur Messung des Blutflusses stellten keine Alternative zur invasiven Blutdruckmessung dar. Aus diesen Gründen wurde in der Vorstudie Teil 1 die invasive Blutdruckmessung mittels Mikro-Tip-Katheter als Methode zur Erfassung kardiovaskulärer Parameter etabliert und in der Hauptstudie verwendet. Unter einem Stereomikroskop (Stemi SV6, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde die Fenestrierung der Eischale erweitert sowie die Chorioallantoismembran (CAM) und das Amnion über dem Kopf des Hühnerembryos eröffnet. Ein geeigneter Seitenast der Chorioallantoisarterie wurde identifiziert und freipräpariert. Um den Blutfluss zum Einbringen des Katheters zu stoppen, wurde die Arterie proximal mit einem Faden angeschlungen und temporär ligiert. Mit einer mikrochirurgischen Schere wurde das Gefäß eröffnet und ein kalibrierter Mikro-Tip-Katheter (FISO-LS Fiber Optic Pressure Sensor, FOP-LS-PT9-10, FISO Technologies Inc., Quebec, Kanada) eingebracht. Dieser wurde im Anschluss mit einer zweiten Ligatur fixiert. Die temporäre proximale Ligatur wurde gelöst, sodass der Blutfluss wiederhergestellt war. Erste Probemessungen wurden in fenestrierten Eiern und in Surrogates an 7 und 14 Tage alten Embryonen (n=10) durchgeführt.

Verhaltensbeobachtungen

Es wurden Surrogates und fenestrierte Eier an ED7 und ED14 verwendet. Im Hinblick auf den in der Vorstudie Teil 2 einzuführenden noxischen Reiz und die bessere Sichtbarkeit des Embryos, wurden die CAM und das Amnion ebenfalls unter dem Stereomikroskop eröffnet und zur Seite präpariert. Nach einer dreiminütigen Ruhephase im Anschluss an die Präparation wurden 10-minütige Baseline-Filmaufnahmen der Hühnerembryonen aufgezeichnet.

Nach der Evaluation verschiedener Aufnahmesysteme fiel die Wahl auf ein externes Kamerasystem, wobei die Filmsequenzen mit einer auf einem Stativ befestigten Kamera (Panasonic LUMIX DC-G110V mit Panasonic Lumix G 30mm-Objektiv, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan; HOYA SUPER PRO1 Revo Filter SMC CIR-PL, Kenko Tokina Co., Ltd., Tokyo, Japan) positionsgleich aufgezeichnet wurden. Im Anschluss erfolgte die Sicherung der Aufnahmen auf einem Computer zur weiteren Auswertung.

Die Auswertung der Bewegungen der Embryonen mit der Deep-Learning-Software DeepLabCut (DLC) (Mathis et al., 2018) wurde an 7 und 14 Tage alten Hühnerembryonen etabliert. Das genaue Vorgehen ist unter 2.3.3 beschrieben. Zur Verifikation der Bewegungsanalyse mittels der DLC-Software wurde eine zweite manuelle Auswertemethode erarbeitet. Dazu wurden in der Vorstudie anhand der erstellten Videos die häufigsten Verhaltensweisen der Hühnerembryonen identifiziert.

Neurohumorale Parameter

Im Rahmen der Vorstudie Teil 1 erfolgte die Etablierung der Probengewinnung und Analyse der neurohumoralen Parameter Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin beim Hühnerembryo.

Die Blutentnahme an einer Vene der CAM für die Blutplasmagewinnung stellte sich als schwer standardisierbar heraus. Das benötigte Probenvolumen pro Zeitpunkt (250 µl) war zu groß, um mehrere Blutentnahmen an einem Embryo durchzuführen. Außerdem nahm die Probenentnahme in diesem Entwicklungsstadium in der Regel mehrere Minuten Zeit in Anspruch, sodass die gezielte Entnahme zu einem definierten Zeitpunkt nicht möglich war.

Aus diesem Grund wurde als Probenmaterial Allantois-/Amnionflüssigkeit verwendet. Im Verlauf der Vorversuche zeigte sich, dass eine Eröffnung des Amnions zur Applikation eines noxischen Stimulus unumgänglich war. Deshalb musste zusätzlich zur CAM das Amnion eröffnet werden, was zu einer Durchmischung beider Flüssigkeiten führte.

Um zu überprüfen, ob sich die Messung der neurohumoralen Parameter aus der Allantois-/Amnionflüssigkeit zur Darstellung einer nozizeptiven Reizantwort im Hühnerembryo eignet, wurde eine Orientierungsstudie durchgeführt. Embryonen der Bruttage 15 bis 18 (n=6) in fenestrierten Eiern erhielten einen noxischen mechanischen Reiz mit einer chirurgischen Klemme (*Pinch*) an der Schnabelbasis. Als Negativkontrolle wurden für jeden untersuchten Bruttag jeweils n=6 Embryonen mitgeführt, bei denen die Schnabelbasis der Embryonen mit der Klemme nur leicht berührt wurden (*Touch*). 250 µl Amnion-/Allantoisflüssigkeit wurden zu den folgenden Zeitpunkten pro Ei entnommen: Baseline (vor Präparation), T1 (0 Min. post Stimulus), T2 (5 Min. post Stimulus), T3 (10 Min. post Stimulus).

Die Proben wurden mit EGTA versetzt und unmittelbar nach Entnahme zentrifugiert (RCF = 2000g, 10 Minuten), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -

80 °C gelagert. Für die Messung der neurohumoralen Parameter wurden die Proben in Kooperation mit dem Bayrischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS, TU München) mittels Massenspektrometrie analysiert. Nach einer Aufbereitung der Proben wurden die Messungen mit einem 5500 Qtrap angeschlossen an Exion-UPLC (beide: AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Elektrophysiologische Parameter

Zur Messung elektrophysiologischer Parameter/EEG im Hühnerembryo wurden modifizierte Messsysteme verwendet, welche im neurobiologischen Labor des Projektpartners Fenzl routinemäßig verwendet werden (Fenzl et al., 2011; Fritz et al., 2021; Fulda et al., 2011; Kreuzer et al., 2015; Polta et al., 2013; Romanowski et al., 2010; Schwitalla et al., 2022). Die akut angewandten EEG-Elektroden bestanden aus rund gezogenem Golddraht (\varnothing 150 μ m, Heffner, München), welche vorsichtig über Mikromanipulatoren (Narishige, Tokyo, Japan) an den Kopf des Embryos herangeführt und epidural platziert wurden. Die gewärmte Lagerung des Embryos erfolgte auf modifizierten Stereotaxiehalterungen (Narishige, Tokyo, Japan) *in ovo*. Die Messelektroden wurden über einen Messvorverstärker (Verstärkerstufe 1x, npi electronics, Tamm, Deutschland) mit individuellen Differentialverstärkern verbunden (DPA-2FL, npi electronics, Tamm, Deutschland). Die EEG-Signale wurden individuell gefiltert (Hardware filter settings: bandpass 0,1 Hz - 100 Hz, notch filter @50 Hz) und zur Offline-Analyse aufgezeichnet (sample rate: 500 Hz, Spike2, CED, Cambridge, England). Sämtliche Stimulationseinheiten waren durch Transistor-Transistor-Logik (TTL) mit der Aufnahmesoftware synchronisiert. Alle elektrophysiologischen Ableitungen erfolgten innerhalb eines Faradaykäfigs.

2.2.3. Etablierung noxischer Stimulus

Im Vorstudienteil 2 galt es, geeignete mechanische, thermische oder elektrische Reize zur noxischen Stimulation des Hühnerembryos zu identifizieren und in das, in Vorstudie Teil 1 erarbeitete, Versuchssetup zu integrieren.

Folgende mechanische, thermische und elektrische Stimuli wurden im Verlauf der Vorstudie auf ihre Eignung zur Stimulation von Hühnerembryonen in den verschiedenen Messsetups getestet:

Mechanische Stimulation

- Pin-Prick-Stimulator (The PIN PRICK, MRC PP07-00044, MRC Systems GmbH, Heidelberg, Deutschland), mit speziell an den Hühnerembryo angepassten Druck von 20 mN
- Klemmreiz, Mosquitoklemme (Fine Science Tools, Foster City, USA) bzw. mikrochirurgische Pinzette (Fine Science Tools, Foster City, USA) (genaue Beschreibung siehe 2.3.2 und 2.3.3)

Thermische Stimulation

- thermischer Stimulator (QST.Lab TCS, Strasbourg, Frankreich), mit speziell an die geringe Größe des Embryos angepasstem Durchmesser der Kontaktstelle (genaue Beschreibung siehe 2.3.4)
- Freeze Lesion, Metallsonde wurde für 1 Minute in flüssigen Stickstoff getaucht und dann für ca. 1 Sekunde an verschiedene Lokalisationen des Embryokopfes gehalten

Elektrische Stimulation

- elektrische Mikrostimulation mit standardisierten Parametern (genaue Beschreibung siehe 2.3.4)



Abbildung 2 Schematische Darstellung der Stimulation mittels Mosquitoklemme (links), Thermostimulator (Mitte), Stimulationselektroden (rechts) eines Hühnerembryos. (Created with BioRender.com.)

2.3. Hauptstudie

2.3.1. Vorbereitung der Hühnerembryonen

Für die Hauptversuche wurden fenestrierte Eier verwendet. Vor der Fenestrierung wurde das Ei mindestens zwei Minuten horizontal gelagert und je nach Größe 5 bis 7 ml Albumin abgezogen. Daraufhin wurde das Ei eröffnet und 0,5 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 units penicillin, 10 mg streptomycin/ml, P4333-100 ml Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden zur Infektionsprophylaxe zugegeben. Anschließend wurde das Ei mit Frischhaltefolie versiegelt und bis zum Versuchstag im Inkubator bebrütet. Die Vitalität der Hühnerembryonen wurde täglich kontrolliert.

Die Experimente wurden unter standardisierten Bedingungen in einer speziell angefertigten Wärmekammer durchgeführt. Diese war mit einer Wärmelampe (Taschenlampenwerk ARTAS GmbH, Arnstadt, Deutschland), einem Luftbefeuchter (HU4811/10 Series 2000, Philips, Amsterdam, Niederlande) und einer Wärmematte (ThermoLux, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) ausgestattet. Zusätzlich wurden die Eier in einer Silikonschale positioniert, welche mit 38 °C warmen Lab Armor Beads™ (Lab Armor Beads™, Sheldon Manufacturing, Cornelius

USA) gefüllt war. Die Umgebungswerte und die Eitemperatur wurden kontinuierlich überwacht.

2.3.2. Kardiovaskuläre Parameter

Es handelte sich um eine explorative Studie. Bei Embryonen von ED12 bis ED18 wurde eine Gruppengröße von $n=10$ gewählt. Zur Tierzahlreduktion und aus Tierschutzgründen wurde aufgrund von größeren Ausfällen bei jüngeren Embryonen die Gruppengröße auf $n=6$ (ED9) bzw. $n=3$ (ED7) reduziert.

Die mittlere Temperatur und die mittlere Luftfeuchtigkeit während der Versuche betragen $37,7 \pm 0,8$ °C und $55,5 \pm 4,3$ %. Der Mikro-Tip-Katheter wurde wie unter 2.2.2 beschrieben in einer Arterie der CAM platziert. Der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sowie die Herzfrequenz (HR) wurden kontinuierlich alle vier Sekunden aufgezeichnet (PLUGSYS Modul, EIM-A, EIM-B, HAEMODYN Software, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland; FFP-LS und Evolution Software, FISO Technologies Inc., Quebec, Kanada). Anschließend wurde der Kopf des Embryos vorsichtig angehoben und der Schnabel auf einen Desmarres-Lidhaken gelegt. Bei jüngeren Embryonen bis ED9 wurde der Schnabel vorsichtig auf eine eigens angefertigte Vorrichtung gelegt.

Nach Implantation des Katheters und Positionierung des Embryos erfolgte eine zweiminütige Erhebung von Baseline-Werten. In randomisierter Reihenfolge wurde entweder ein mechanischer Reiz mit einer chirurgischen Klemme (*Pinch*) an der Schnabelbasis oder, als Negativkontrolle, nur eine leichte Berührung (*Touch*) der Schnabelbasis angewendet. Zwischen den beiden Reizen wurde ein Zeitraum von 5 Minuten zur Normalisierung der Parameter eingehalten. Nach dem zweiten Stimulus wurde die Messung für 5 Minuten fortgesetzt. Aufgrund der zunehmenden Empfindlichkeit des Organismus wurde die Messzeit zwischen den beiden Reizen und nach dem zweiten Reiz bei ED13 und jüngeren Embryonen von 5 auf 3 Minuten reduziert.

Für den *Pinch* wurde die chirurgische Klemme an der Schnabelbasis angesetzt und zusammengedrückt. Beim *Touch* wurde der Schnabel nur leicht mit der chirurgischen Klemme berührt. Für ED15- bis ED18-Embryonen wurde eine Mosquitoklemme verwendet. Für Embryonen an ED7 und ED9 war der Durchmesser der chirurgischen Klemme zu groß, sodass stattdessen eine mikrochirurgische Pinzette verwendet wurde. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Stimuli immer von derselben Person angewendet. Im weiteren Verlauf der Studie wurde für ED12 bis ED14 eine Mosquitoklemme mit Analgesiameter (BIO-RP-M, BioSeb, Vitrolles, Frankreich), mit dem der angewendete Druck gemessen werden konnte, verwendet, um eine noch bessere Standardisierung des mechanischen Reizes zu ermöglichen.

Zur Verifikation der gemessenen kardiovaskulären Reaktionen wurde eine zusätzliche Versuchsgruppe an ED18 mitgeführt, um zu untersuchen, ob die Applikation eines Lokalanästhetikums die Reaktion auf den *Pinch* reduzieren kann. Es wurden $n=6$ Embryonen

untersucht (*ED18 w/ Lido Touch* bzw. *ED18 w/ Lido Pinch*). Dafür wurde im Anschluss an die Präparation 0,02 ml Lidocain 2 % (Xylocitin® 2 %, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland) ohne Sperrkörper in den Ober- und Unterschnabel injiziert. Es wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie bei ED14- bis ED18-Embryonen mit einer zusätzlichen Einwirkzeit von 3 Minuten vor Beginn der Messung verwendet.

Im Folgenden ist eine Übersicht über die Versuchsgruppen der kardiovaskulären Parameter (Tabelle 1) und den Versuchsaufbau (Abbildung 3) dargestellt.

Tabelle 1 Übersicht über die Versuchsgruppen der kardiovaskulären Parameter.

Brutttag*	ED7	ED9	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18 w/o Lido	ED18 w/ Lido
Gruppen- größe (n)	3	6	10	10	10	10	10	10	10	6
Mechanischer Stimulus	Chirurgische Pinzette			Mosquitoklemme						

* Zur Tierzahlreduktion wurde auf Messungen an ED8, ED10 und ED11 verzichtet.

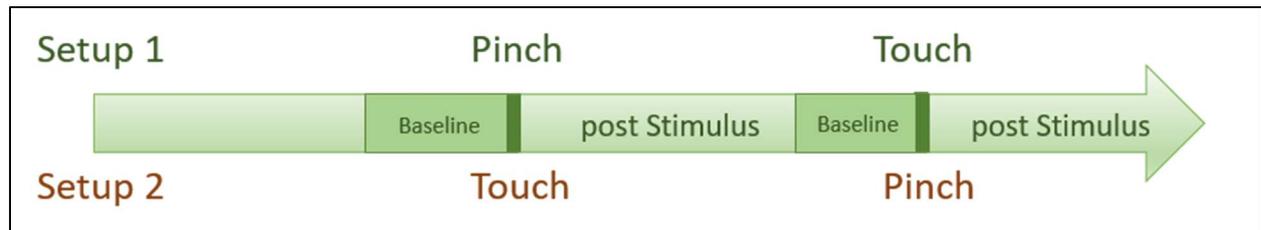


Abbildung 3 Schematischer Zeitstrahl des Versuchsablaufs. In Setup 1 wurde als erster Stimulus der *Pinch* und in Setup 2 zuerst der *Touch* appliziert.

Auswertung

Für MAP und HR wurde der Mittelwert über eine Minute vor dem jeweiligen Stimulus (Baseline) und eine Minute nach dem Stimulus berechnet. Anschließend wurde die prozentuale Abweichung nach dem Reiz (*Pinch/Touch*) zur Baseline berechnet. Die Unterschiede der prozentualen Abweichungen zur Baseline im MAP und der HR nach *Touch* und *Pinch* wurden mit einem t-Differenzentest (normalverteilte Daten: MAP: ED12, ED13, ED16, ED18, ED18 w/Lido; HR: ED7, ED13, ED14, ED15, ED17, ED18) bzw. einem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht normalverteilte Daten: MAP: ED7, ED9, ED14, ED15, ED17; HR: ED9, ED12, ED16, ED18 w/ Lido) auf Signifikanz getestet. Zusätzlich wurden „shaded mean“-Darstellungen zur besseren Veranschaulichung der Daten erstellt. Hierzu wurde der Mittelwert von MAP und HR über eine Minute vor dem jeweiligen Stimulus als Baseline verwendet. Dann wurde über eine Minute vor und eine Minute nach dem jeweiligen Stimulus von jedem Wert alle 4 Sekunden die prozentuale Abweichung zur Baseline berechnet und über die Zeit aufgetragen.

2.3.3. Verhaltensparameter

Die mittlere Temperatur und die mittlere Luftfeuchtigkeit während der Versuche betragen $37,8 \pm 0,95$ °C und $55,5 \pm 4,47$ %. Um die Beobachtung des gesamten Embryos zu ermöglichen, wurde zunächst das Fenster in der Eischale vergrößert. Anschließend wurde die CAM vorsichtig eröffnet und außer Sichtweite präpariert. Falls erforderlich, wurden kleinere Gefäße ligiert. Der Kopf des Embryos wurde wie bei den kardiovaskulären Parametern auf einer Vorrichtung vorsichtig platziert.

Tabelle 2 Übersicht über die Versuchsgruppen der Verhaltensparameter. m=männlich, w=weiblich.

Brutttag*	ED9	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18 w/o Lido	ED18 w/ Lido
Gruppengröße (n) DeepLabCut	10	10	10	15	16	16	16	15	5
Gruppengröße (n) Manuelle Auswertung	10	10	10	16	16	16	16	16	5
Mechanischer Stimulus	Chirurgische Pinzette	Mosquitoklemme							
Geschlecht (m/w)	5/5	3/7	5/5	9/7	7/9	7/8	7/9	7/9	2/3

* Zur Tierzahlreduktion wurde auf Messungen an ED7, ED8, ED10 und ED11 verzichtet.

Die Hühnerembryonen wurden mit einer Kamera (Panasonic LUMIX DC-G110V kombiniert mit einem Panasonic Lumix G 30mm Objektiv, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan, und ab ED14 einem HOYA SUPER PRO1 Revo Filter SMC Cir-PL, Kenko Tokina Co, Ltd., Tokyo, Japan) mit einer Auflösung von 50 Frames/Sekunde gefilmt. Ein Frame entspricht hierbei einem Bild. Die Positionierung der Kamera auf einem Stativ war für jeden Embryo gleich. Nach der Präparation wurde eine dreiminütige Erholungsphase abgewartet, bevor die Videoaufzeichnung gestartet wurde. Zunächst wurde eine zweiminütige (ED15 bis ED18) bzw. dreiminütige (ED9, ED12 bis ED14) Baseline gefilmt. Anschließend erhielt jeder Embryo zwei Stimuli in randomisierter Reihenfolge im Abstand von 5 (ED15 bis ED18) bzw. 6 Minuten (ED9, ED12 bis ED14). Nach Applikation des zweiten Stimulus wurde das Verhalten über weitere fünf Minuten gefilmt (siehe Abbildung 3). Bei den angewandten Reizen handelte es sich um einen noxischen mechanischen Reiz (*Pinch*) und als negative Kontrolle um eine leichte Berührung (*Touch*), analog zum Vorgehen bei den kardiovaskulären Parametern. Für den mechanischen Reiz wurden wie auch bei den kardiovaskulären Parametern die folgenden Instrumente verwendet: chirurgische

Pinzette (ED9), Mosquitoklemme mit Analgesiameter (ED12 bis ED14) und Mosquitoklemme (ED15 bis ED18).

Zur Verifikation der beobachteten Reaktionen wurde auch in den Verhaltensbeobachtungen eine zusätzliche Versuchsgruppe an ED18 mitgeführt, um zu untersuchen, ob die Applikation eines Lokalanästhetikums die Reaktion auf den *Pinch* reduzieren kann. Es wurden n=5 Embryonen untersucht (*ED18 w/ Lido Touch* bzw. *ED18 w/ Lido Pinch*). Dafür wurde im Anschluss an die Präparation 0,02 ml Lidocain 2 % (Xylocitin® 2%, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland) ohne Sperrkörper in den Ober- und Unterschnabel injiziert. Die Injektion des Lidocains erfolgte 5 Minuten vor Beginn der Baseline-Aufnahme. Ab diesem Zeitpunkt wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie bei ED18-Embryonen verwendet. Die Versuche wurden immer von denselben zwei Personen durchgeführt, um eine bestmögliche Standardisierung zu erreichen.

Auswertung

Im Anschluss an die Messungen wurden die Videoaufzeichnungen auf einen speziellen, leistungsstarken Computer (MSI MAG Infinite 11TC-1222AT, Intel Core i7-11700F, 16 GB RAM, nVidia GeForce RTX 3060) übertragen und gesichert. Alle Videos wurden mit der Software daVinci Resolve (Blackmagic Design Pty. Ltd., Port Melbourne, Australien) bearbeitet, sodass für jeden Embryo insgesamt vier Einzelvideos entsprechend der folgenden Versuchskonditionen geschnitten werden konnten: *Baseline Pinch*, *Baseline Touch*, *post Pinch* und *post Touch*. Die beiden Baselines bestanden hierbei aus jeweils 6000 Frames, was einer Länge von zwei Minuten entspricht, die beiden post-Stimulus-Videos aus jeweils 9000 Frames, was 3 Minuten entspricht.

Auswertung mit DeepLabCut (DLC)

Zur Verfolgung der Bewegungen des Embryos wurde die Deep-Learning-Software DeepLabCut (DLC) (Version: 2.2.1.1; Mathis et al., 2018) verwendet. Für jeden Bruttag wurde die Software individuell mit dem verfügbaren Material gemäß dem Protokoll von Nath et al. (2019) trainiert. Nach dem Training wurden für jeden Embryo die vier erstellten Videos (*Baseline Pinch*, *Baseline Touch*, *post Pinch* und *post Touch*) ausgewertet. Für jedes gelabelte Körperteil erstellte DLC drei Ausgaben pro Einzelbild des Videos: eine x-Koordinate, eine y-Koordinate und einen Likelihood-Wert. Der Likelihood-Wert beschreibt die Sicherheit des Programmes, dass ein Punkt fehlerfrei verfolgt wurde. Diese Werte wurden mit einem selbst geschriebenen Code in MATLAB R2019a (MATLAB Version: 9.12.0.1927505 (R2022a) Update 1, Mathworks) analysiert. In allen Fällen wurde für die Verwendung eines Punktes ein Likelihood-Wert von mindestens 0,75 (= 75 %) vorausgesetzt.

Die Analyse konzentrierte sich auf die folgenden Körperbereiche (Abbildung 4):

- 1) Schnabel
- 2) Kopf
- 3) Gliedmaßen
- 4) Stationäre Punkte auf dem Ei wurden als Referenzkontrolle verwendet.

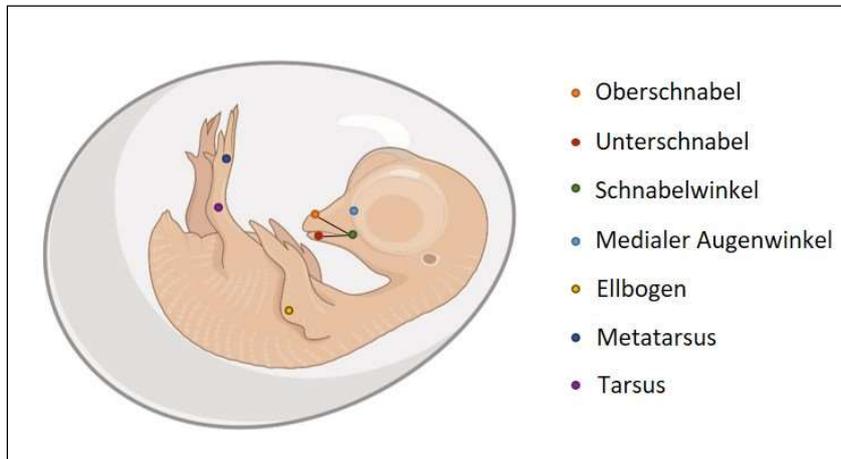


Abbildung 4 Übersicht gelabelter Körperteile eines Hühnerembryos mit der Software *DeepLabCut*. (Created with BioRender.com.)

In einem ersten Schritt wurden die beschrifteten Datencluster für jeden analysierten Körperteil im x-y-Koordinatenraum visualisiert. Dadurch konnte der Datensatz verfeinert werden, indem Ausreißer oder falsch beschriftete Körperteile identifiziert und entfernt wurden.

Abstand zwischen Ober- und Unterschnabel (Distance between upper and lower beak)

Der Abstand zwischen der oberen und unteren Begrenzung des Schnabels wurde gemessen. Dazu wurde der euklidische Abstand zwischen zwei Punkten gemessen,

$$d = \sqrt{[(x_u - x_l)^2 + (y_u - y_l)^2]}$$

wobei x_u die x-Koordinate der oberen Schnabelmarke, x_l die x-Koordinate der unteren Schnabelmarke, y_u die y-Koordinate der oberen Schnabelmarke und y_l die y-Koordinate der unteren Schnabelmarke ist. Der euklidische Abstand wurde in Pixeln für jedes Einzelbild des Videos berechnet.

Winkel zwischen Ober und Unterschnabel (Angle between upper and lower beak)

Der Winkel zwischen dem oberen und dem unteren Schnabel wurde berechnet, indem der Winkel zwischen zwei Linien P_0 zu P_1 und P_0 zu P_2 berechnet wurde, wobei P_0 der Drehpunkt zwischen den Schnabelteilen, P_1 der obere Schnabelpunkt und P_2 der untere Schnabelpunkt ist. Der Winkel wurde dann wie folgt berechnet:

$$\text{Angle} = \text{atan2}(\text{norm}(\det([n_2; n_1])), \text{dot}(n_2, n_1))$$

Dabei ist *atan2* der inverse Tangens des Vierquadranten, *det* die Matrixdeterminante, *dot* das Punktprodukt und n_2, n_1 sind die euklidisch normierten Vektoren für P_0 zu P_1 und P_0 zu P_2 . Der

Winkel zwischen Ober- und Unterschnabel wurde für alle Frames des Videos im Bogenmaß berechnet, dann in Grad umgerechnet.

Bewegungen (Movement)

Bewegungen von Körperteilen, medialer Augenwinkel (*Movement Eyecorner*), Ellbogen (*Movement Elbow*), Metatarsus (*Movement Metatarsus*), wurden als der euklidische Abstand zwischen identischen Markierungen in aufeinanderfolgenden Bildern berechnet,

$$d = \sqrt{[(x_{f1} - x_{f2})^2 + (y_{f1} - y_{f2})^2]}$$

wobei x_{f1} die x-Koordinate für Bild 1, x_{f2} die x-Koordinate für Bild 2, y_{f1} die y-Koordinate für Bild 1 und y_{f2} die y-Koordinate für Bild 2 ist. Die Abstände wurden für alle aufeinanderfolgenden Bilder berechnet. Als Ersatz für den noch nicht deutlich entwickelten Metatarsus an ED9 wurde der Tarsus verfolgt (*Movement Tarsus*).

Bei bis zu 5 % fehlenden Werten für einen Parameter wurden diese manuell imputiert, andernfalls wurde das Datenset ausgeschlossen. Für jede Reihe fehlender Werte wurde der Median für die Hälfte deren Anzahl der angrenzenden Daten zuvor und danach gebildet und anstelle des fehlenden Wertes verwendet. Zur Vereinfachung der Auswertung wurden für alle Körperteile vor und nach dem Stimulus immer 30-Sekunden-Intervalle (entsprechend 1500 Frames) ausgewertet. Dazu wurde die Summe der Werte gebildet. Für die Baseline wurde der Median aus den Summen der vier 30-Sekunden-Blöcke der zwei Minuten Baseline vor Stimulus gebildet. Insgesamt wurden somit für jeden Zeitraum (*Touch* oder *Pinch*) vier definierte Zeitpunkte post Stimulus (0-30, 30-60, 60-90 und 90-120) und eine Baseline (BL -30-0) ausgewertet.

Statistische Auswertung DLC

Aufgrund von Messwiederholungen wurden generalisierte lineare gemischte Modelle auf Einzeltierbasis als zufallsbedingter Effekt für die Analysen verwendet. Da einige Modellannahmen verletzt wurden (Normalverteilung der Residuen, Heteroskedastizität der Residuen, Heterogenität der Varianzen zwischen Versuchsgruppen und Vorhandensein von Ausreißern), wurden nur robuste lineare gemischte Modelle für die Analysen gewählt (R package - *robustlmm*). Die vorliegenden Daten wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsvariablen (Stimulus (*Pinch*, *Touch*) und Zeitintervall (*Baseline*, Zeiträume *post Stimulus*)) untersucht.

Alle Unterschiede zwischen den entsprechenden Gruppen wurden nach Modellanpassung mit Hilfe von geschätzten Randmittelwerte (*emmean*) mit Tukey-post-Hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. Unterschiede mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software R 4.2.1 (2022-06-23).

Manueller Score

Für den manuellen Score wurde dasselbe Videomaterial wie für die DLC-Analysen verwendet. Zunächst wurden anhand der Videos für jeden Bruttag die häufigsten Schnabelbewegungen des Embryos identifiziert. Vier verschiedene Muster von Schnabelbewegungen wurden anhand des Videomaterials ausgewertet:

- "Beak Movement": kleine horizontale Verschiebebewegung von Ober- und Unterschnabel gegeneinander
- "Mandibulation": geringgradige Verschiebungs-/Öffnungsbewegungen über teilweise einige Sekunden, die an Kaubewegungen erinnern
- "Beak Opening": vertikale Öffnung des Schnabels
- "Wide Beak Opening": weite vertikale Öffnung des Schnabels mit charakteristischer Zungenbewegung

Ausgewertet wurden jeweils 30 Sekunden der Baseline und vier 30-Sekunden-Intervalle direkt nach dem jeweiligen Reiz (post Stimulus 0-30, 30-60, 60-90, 90-120 Sekunden). Für jedes Zeitintervall wurde die Anzahl der Schnabelbewegungen gezählt bzw. ob das Verhalten beim Einzeltier beobachtet wurde. Die Auswertung erfolgte immer durch dieselbe Person.

2.3.4. Elektrophysiologische Parameter

Sämtliche Versuchsparameter und technischen Voraussetzungen zu den EEG-Aufnahmen wurden bereits vollständig im Rahmen der Vorstudien (siehe 2.2) etabliert und evaluiert.

Tabelle 3 Übersicht aller in den elektrophysiologischen Experimenten verwendeten Embryonen. Erhöhung der Tierzahl an den relevanten Bruttagen (ED7, ED12, ED13, ED18, ED19).

Bruttag (ED)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Gesamt
Vor- und Hauptversuche EEG Anzahl (n)	36	9	8	9	18	56	57	14	13	17	18	40	56	361
Histologie Anzahl (n)	21					23	16					3	15	80

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden insgesamt (Vor- und Hauptversuche) 361 Embryonen für die EEG-Studie verwendet. Davon wurden Aufnahmen von 52 Embryonen wegen Messartefakten verworfen. Thermisch stimuliert wurden insgesamt 61 Embryonen, elektrisch stimuliert insgesamt 103 Embryonen. Zu den Tagen ED12 und ED13 wurden darüber hinaus 26 zusätzliche Embryonen in die Messungen aufgenommen. Eine randomisierte Positionierung der EEG-Ableitpositionen über das gesamte Hyperpallium wurde an insgesamt 15 Embryonen durchgeführt. Abschließend wurden insgesamt 80 Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstufen zur Darstellung histologischer Präparate verwendet.

Thermostimulation

Die thermischen Reize wurden mittels einer gepulsten Stimulusreihe (40 Einzelstimuli, Interstimuli-Intervall: 10 s) durch ein Peltier-Element (TCS, QST.Lab, Strasbourg, Frankreich) appliziert (siehe Abbildung 5). Die applizierte Maximaltemperatur betrug 51 °C und lag damit über publizierten thermal-nozizeptiven Schwellwerten (Gentle & McKeegan, 2001; Hothersall et al., 2011; Hothersall et al., 2014).

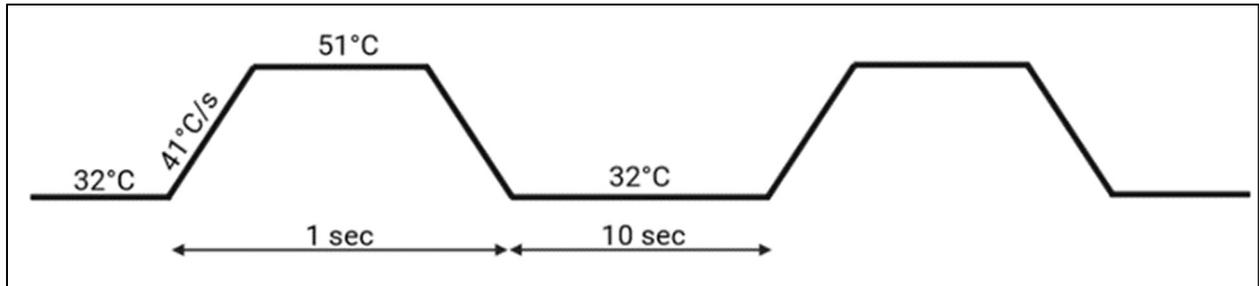


Abbildung 5 Stimmulationsprofil thermischer Stimmulationen während EEG-Aufnahmen. Ausgehend von einer Basistemperatur am Peltier-Element erfolgte nach Hautkontakt eine thermale Stimmulation von 51 °C mit einer Aufheizrate von 41 °C/s, gefolgt von 10 Sekunden mit 32 °C am Peltier-Element. Dieses Muster wurde in einer gepulsten thermischen Stimmulation im Rahmen einer zusammenhängenden EEG-Aufnahme insgesamt 40x wiederholt.

Elektrische Stimmulation

Die Applikation elektrischer Reize erfolgte über eine monopolare Tungsten-Elektrode (TM33A20, World Precision Instruments, Friedberg, Deutschland) durch eine standardisierte Stimulusreihe aus einem galvanisch isolierten Gleichstromstimulator (ISO-STIM 01B, npi electronics, Tamm, Deutschland) mit einer konstanten Stromstärke von 1 mA (Bogdanov et al., 1984; Ring & Willoughby, 2013). Das Stimmulationsprofil (siehe

Abbildung 6) enthielt eine in 5 Sekunden wiederholt applizierte Pulsfolge (Stimulus: 150 µs, Interstimulus-Intervall: 5 ms, Pulsdauer: 40 ms, 90 Wiederholungen) (Fenzl & Schuller, 2002; Fenzl & Schuller, 2005; Fenzl & Schuller, 2007).

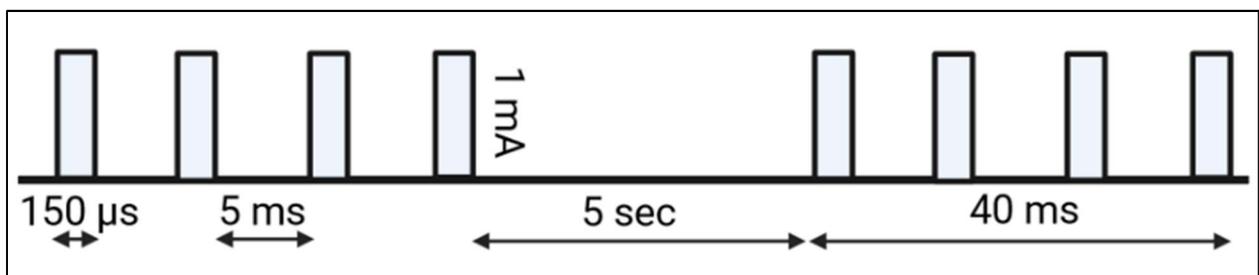


Abbildung 6 Stimmulationsprofil elektrischer Stimmulationen während EEG-Aufnahmen. Zusammensetzung einer Pulsfolge aus Einzelstimuli mit einem Interpuls-Intervall von 5 s.

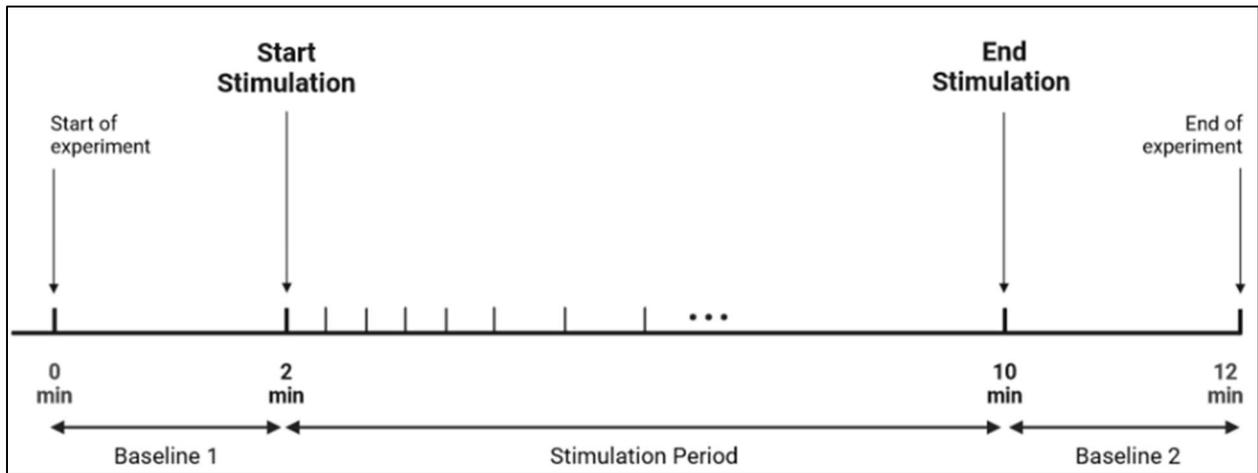


Abbildung 7 Allgemeines Stimulationsprofil.

Sämtliche Stimulationsexperimente zur Messung neuronaler Aktivitäten im Rahmen der EEG-Messungen erfolgten nach einem klar definierten Schema. Nach der Präparation des Embryos *in ovo* und dem Aufsetzen der EEG-Elektroden erfolgte eine Messung neuronaler Grundaktivität von 2 Minuten (Minute 0 bis Minute 2). Danach erfolgte die standardisierte Applikation der elektrischen und thermischen Reize in einem Zeitfenster von 8 Minuten (Minute 2 bis Minute 10). Anschließend wurde weiter die neuronale Grundaktivität aufgezeichnet (Minute 10 bis Minute 12). Die EEG-Messungen erfolgten kontinuierlich von Minute 0 bis Minute 12.

Sämtliche Aufnahmen wurden offline ausgewertet. Dabei erfolgte zunächst eine visuelle Sichtung der rohen EEG-Aufnahmen, nicht auszuwertende Aufnahmen (zumeist induzierte Bewegungsartefakte) wurden hierbei verworfen. Ob eine EEG-Aufnahme in die weitere Auswertung aufgenommen wurde, wurde anhand der Qualität der basalen Messungen individuell für jede Messung entschieden.

Aus der Summe der vorselektierten EEG-Aufnahmen wurden zufällig jeweils 6 Datensätze aus den Aufnahmen für jedes Entwicklungsstadium zur weiteren Analyse ausgewählt. Auswertbare rohe EEG-Aufnahmen wurden via .txt-Dateien als Vektordatei codiert (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) und in die MATLAB-Toolbox EEGLAB (Delorme & Makeig, 2004) importiert. Da die meisten automatisierten Routinen zur Artefaktunterdrückung, wie z. B. die "Artefakt-Subspace-Rekonstruktion" (ASR), nur für Humandaten validiert sind (Chang et al., 2018), wurde eine manuelle Auswahl von Datensätzen etabliert und alle Datensätze unberücksichtigt gelassen, die eine Amplitude von $\pm 500 \mu\text{V}$ für mehr als 10 % der Aufnahmezeit überschritten. Zur temporalen Analyse wurden die ausgewählten Datensätze auf 15 Sekunden (s, Epochenlänge) beschränkt, das EEG-Signal von -1 s bis +2 s um den Beginn jedes Stimulus (thermisch, elektrisch) eingegrenzt und anschließend eine „event-related spectral perturbation“ (ERSP) und die „inter-trial coherence“ (ITC) gemäß den Routinen aus den früheren Veröffentlichungen des Projektpartners (Anders et al., 2023; Anders et al., 2023) berechnet. Dabei wurde die „newtimef“-Funktion von EEGLAB mit einer geteilten Basislinie von -1 s bis 0 s,

einer zeitlichen Auflösung von 400 Punkten von -1 s bis +2 s und einer Frequenzauflösung von 200 Punkten zwischen den Frequenzen von 3 Hz bis 100 Hz (Grandchamp & Delorme, 2011; Herrmann et al., 2014) verwendet. Dabei kamen Wavelet-Transformationen der „newtimef“-Funktion mit 3 Zyklen bei der niedrigsten Frequenz von 3 Hz und 20 Zyklen bei der höchsten Frequenz von 100 Hz an den EEG-Aufnahmen von definierten Elektrodenpositionen zur Anwendung.

In den ERSP-Diagrammen wurde jede Deaktivierung oder Aktivierung unterhalb eines Schwellenwerts von -2 dB oder oberhalb eines Schwellenwerts von 2 dB als eine Reaktion auf den Stimulus betrachtet (Anders et al., 2023; Anders et al., 2023). Der Median der ERSP- und ITC-Daten wurde lediglich für ED19-Embryonen berechnet, da primär davon ausgegangen wurde, dass eine physiologische Reaktion, wenn überhaupt zuallererst im letzten von den analysierten Entwicklungsstadien manifestiert ist. Zusätzlich wurde definiert, dass eine phasengekoppelte Reaktion im EEG nach elektrischer Stimulation relativ unmittelbar (< 100 ms), nach der thermischen Stimulation jedoch aufgrund der Aufheizzeit der Thermode deutlich später (> 100 ms, aber vor 800 ms) erscheint. Diese Erwartungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Studien am Menschen (Anders et al., 2022; Anders et al., 2023). Zur Berechnung der Leistungsspektraldichte (power spectral density, PSD) der selektierten EEG-Aufnahmen wurde die „pwelch“-Funktion aus der MATLAB Signal Processing Toolbox verwendet und das „density spectral array“ (DSA) als logarithmierter (\log_{10}) Durchschnitt über alle Embryonen dargestellt.

Statistik, EEG-Auswertung

Bei der Extraktion der ERSP- und ITC-Werte wurden die minimalen bzw. maximalen ERSP- und ITC-Werte und ihre jeweiligen 25 %- und 75 %-Quartile sowie der Zeitpunkt und die Häufigkeit ihres Auftretens abgebildet. Dieser Ansatz wurde unabhängig von der gewählten Fenstergröße bei der Extraktion der ERSP-Daten gewählt. Für den statistischen Vergleich der PSD-Mittelwerte wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße ($n=6$) (Mishra et al., 2019) und seiner Eignung für die Analyse von EEG-Daten (Maris & Oostenveld, 2007) ein nichtparametrischer statistischer Ansatz (Mann-Whitney-U-Test) verwendet.

Histologie

Nach den EEG-Messungen wurden die Gehirne von ED7-, ED12-, ED13- und ED19-Embryonen histologisch aufgearbeitet. Zuerst wurden die Gehirne für mindesten 24 Stunden in Paraformaldehyd (4 % PFA 1x PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelegt und anschließend in eine Saccharoselösung (30 %) überführt. Danach wurden die Gehirne in Gelatinelösung (Gelatine, Saccharose, Triton X100, mQ H₂O) eingelegt und erneut mit PFA und Saccharoselösung für jeweils eine Stunde behandelt. Anschließend wurden die Gehirne frontal geschnitten (Kryotom, Schnittdicke: 100 µm), auf mit Gelatine behandelte Objektträger aufgetragen und zur anatomischen Betrachtung einer standardisierten Cresylviolett-Färbung unterzogen.

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1. Vorstudien

3.1.1.1. Etablierung Versuchssetup

Zur Entscheidungsfindung, welches der Ei-Systeme sich als Versuchssetup eignet, wurden die verschiedenen Messsysteme in fenestrierten Eiern und in Surrogate-Eiern an ED7 und ED14 integriert. Fenestrierte Eier und Surrogates eigneten sich gleichermaßen für die Beantwortung der Fragestellung. Aufgrund der physiologischeren Bedingungen und der einfacheren Herstellung wurden die fenestrierten Eier in den Hauptversuchen verwendet.

3.1.1.2. Etablierung Messparameter

Kardiovaskuläre Parameter

Verschiedene Messsysteme wurden für die Erhebung der kardiovaskulären Parameter im Hühnerembryo getestet. Am sensitivsten stellte sich für die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz im Hühnerembryo die intraarterielle Messung mittels Mikro-Tip-Katheter dar. Diese konnte erfolgreich in 7 und 14 Tage alten Hühnerembryonen etabliert werden.

Neurohumorale Parameter

Mittels Massenspektrometrie konnte Dopamin an ED15 bis ED18 detektiert und quantifiziert werden. Noradrenalin war detektierbar, jedoch war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in vielen Proben zu gering, um Konzentrationen quantifizieren zu können. Adrenalin war nicht detektierbar.

In einer Orientierungsstudie konnten keine Veränderungen der Dopaminkonzentrationen als Reaktion auf einen mechanischen Stimulus (*Pinch*) beobachtet werden (Tabelle 4). Gründe dafür könnten das verwendete Probenmaterial und die Entnahmetechnik gewesen sein. Für die mechanische Stimulation und Probenentnahme mussten sowohl die Amnion- als auch die Allantoishöhle eröffnet werden, sodass eine Mischung beider Flüssigkeiten unvermeidbar war. Eine Standardisierung des Probenmaterials wurde dadurch erschwert. Die Baseline-Werte von Dopamin und Noradrenalin wiesen zumeist die höchsten gemessenen Konzentrationen auf. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass es bereits bei der Präparation zu erhöhten Stressreaktionen und somit zur Ausschüttung von neurohumoralen Stressparametern kam.

Das in der Vorstudie etablierte Versuchssetup für die Analyse der neurohumoralen Parameter stellte sich somit als nicht geeignet zur Untersuchung nozizeptiver Reaktionen im Hühnerembryo heraus. In der Hauptstudie wurde deshalb auf die Bestimmung der neurohumoralen Parameter verzichtet.

Tabelle 4 Dopaminkonzentrationen in ng/l aus der Allantois-/Amnionflüssigkeit von ED15- bis ED18-Embryonen nach *Touch* und *Pinch*. Darstellung des Mittelwerts \pm Standardabweichung der Gruppen (n=6) zu den Zeitpunkten vor (Baseline) und 0 (T1), 5 (T2) und 10 (T3) Minuten nach Stimulation.

Brutttag	ED15		ED16		ED17		ED18	
	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>
Baseline	1,61 \pm 0,68	0,97 \pm 1,23	1,35 \pm 0,74	1,13 \pm 0,54	2,35 \pm 1,38	2,45 \pm 1,84	1,64 \pm 1,45	0,72 \pm 0,62
T1	1,54 \pm 0,65	0,66 \pm 0,64	1,35 \pm 0,49	0,89 \pm 0,42	2,10 \pm 1,02	2,82 \pm 1,72	1,49 \pm 1,38	0,62 \pm 0,48
T2	1,45 \pm 0,63	0,66 \pm 0,41	1,20 \pm 0,64	0,79 \pm 0,36	1,98 \pm 0,84	1,96 \pm 1,67	1,22 \pm 1,16	0,61 \pm 0,42
T3	1,27 \pm 0,60	0,52 \pm 0,46	1,15 \pm 0,72	0,73 \pm 0,32	1,77 \pm 0,66	2,29 \pm 1,45	0,83 \pm 0,67	0,75 \pm 0,55

Verhaltensparameter

Ein Versuchsaufbau zur Erfassung der Bewegungen von Hühnerembryonen und die Auswertung mittels DeepLabCut konnten erfolgreich im Rahmen der Vorstudie etabliert werden. Zur Verifikation der Bewegungsanalyse mittels DLC wurde eine zweite manuelle Auswertmethode erarbeitet, bei der Verhaltensweisen manuell gezählt und bewertet wurden.

Elektrophysiologische Parameter

Die Etablierung sämtlicher EEG-Methoden und den entsprechenden Stimulations- und Aufzeichnungsparametern im Hühnerembryo erfolgte im Rahmen der Vorstudie.

3.1.1.3. Etablierung noxischer Stimulus

Mechanischer Stimulus

- Pin-Prick-Stimulator

Der Druck, der mit dem Pin-Prick-Stimulator angewendet wurde, erwies sich als zu stark, da es zu einer Penetration der Haut des Embryos kam. Aus diesem Grund wurde der Pin-Prick-Stimulator nicht für die Hauptversuche verwendet.

- Mosquitoklemme/mikrochirurgische Pinzette

Der mechanische Stimulus mit der chirurgischen Klemme (Mosquitoklemme bzw. mikrochirurgische Pinzette) konnte erfolgreich für die kardiovaskulären und Verhaltensparameter etabliert und an die jeweiligen Bruttage angepasst werden.

Sämtliche zur mechanischen Stimulation verwendeten Geräte verursachten hinreichend große Verschiebungen der Lage des Embryos, um an den EEG-Elektroden

Bewegungsartefakte zu induzieren. Diese Artefakte waren einerseits in ihren Amplituden größer als die primären elektrischen Signale aus dem Hyperpallium des Embryos. Andererseits erschienen diese Artefakte während den ersten 500 ms der akuten Messungen und überschrieben somit jegliche physiologischen Signale. Eine sinnvolle Messung neuronaler Aktivitäten während mechanischer Stimuli war somit nicht möglich.

Thermischer Stimulus

- Thermostimulator

Die Applikation eines standardisierten thermischen Reizes konnte im elektrophysiologischen Setup etabliert und an die jeweiligen Bruttage angepasst werden. In den restlichen Setups konnte die Thermostimulation aufgrund der Schwierigkeit der Integration in das jeweilige Messsystem nicht implementiert werden.

Elektrischer Stimulus

- elektrische Mikrostimulation

Ein geeigneter, standardisierter, elektrischer Reiz konnte erfolgreich im elektrophysiologischen Setup etabliert und an die jeweiligen Bruttage angepasst werden. In den restlichen Setups konnte die elektrische Stimulation aufgrund der Schwierigkeit der Integration in das jeweilige Messsystem nicht implementiert werden.

3.1.2. Hauptstudie

3.1.2.1. Kardiovaskuläre Parameter

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HR) bei Hühnerembryonen

Basiswerte von systolischem (SAP), diastolischem (DAP) und mittlerem arteriellem Blutdruck (MAP) und HR wurden bei Embryonen an ED7, ED9 und ED12 bis ED18 über eine Minute erfasst. Der MAP stieg mit zunehmendem Alter der Embryonen an. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Mittelwerte \pm SD des systolischen (SAP), diastolischen (DAP) und mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) sowie der Herzfrequenz (HR) an ED7 (n=3), ED9 (n=6) und ED12 bis ED18 (n=10) in fenestrierten Eiern.

Brutttag	ED7	ED9	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18
SAP [mmHg]	3,50 \pm 0,65	6,04 \pm 1,46	9,19 \pm 1,32	9,88 \pm 1,52	13,02 \pm 1,60	16,54 \pm 3,04	21,44 \pm 2,78	24,46 \pm 5,50	24,65 \pm 4,36
DAP [mmHg]	1,07 \pm 0,36	1,98 \pm 1,10	2,20 \pm 1,12	2,96 \pm 0,61	3,95 \pm 1,14	5,69 \pm 1,82	7,80 \pm 2,16	10,77 \pm 3,53	11,43 \pm 2,43
MAP [mmHg]	2,08 \pm 0,40	3,44 \pm 1,24	4,83 \pm 1,05	5,52 \pm 0,79	7,32 \pm 1,26	10,11 \pm 3,06	13,73 \pm 0,77	16,79 \pm 4,21	17,28 \pm 3,04
HR [bpm]	128,97 \pm 15,40	147,57 \pm 9,03	159,08 \pm 26,64	146,61 \pm 19,99	179,10 \pm 35,06	154,33 \pm 35,49	151,35 \pm 35,49	179,08 \pm 29,17	176,07 \pm 35,75

Untersuchung der kardiovaskulären Reaktion auf einen noxischen Stimulus an ED7, ED9, ED12, ED13 und ED14

Bei Embryonen \leq ED14 konnte weder im MAP noch in der HR eine signifikante Reaktion auf den *Pinch* im Vergleich zu *Touch* festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 bis Abbildung 14 dargestellt.

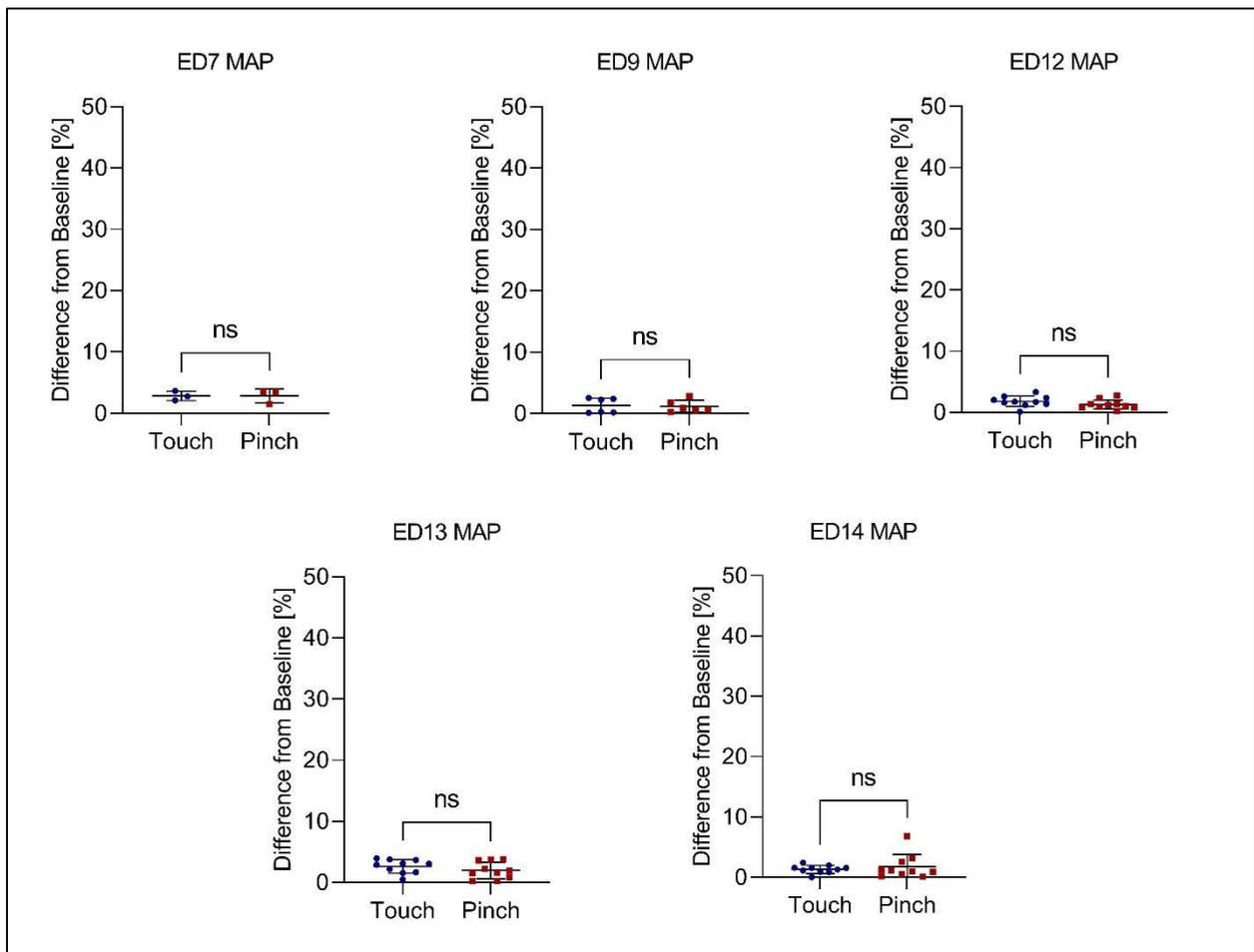


Abbildung 8 Prozentuale Abweichungen von der Baseline im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) nach *Touch* und *Pinch* an den Bruttagen ED7 (n=3), ED9 (n=6) und ED12 bis ED14 (n=10). *t*-Differenzentest (normalverteilt) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht normalverteilt). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung. ns = kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

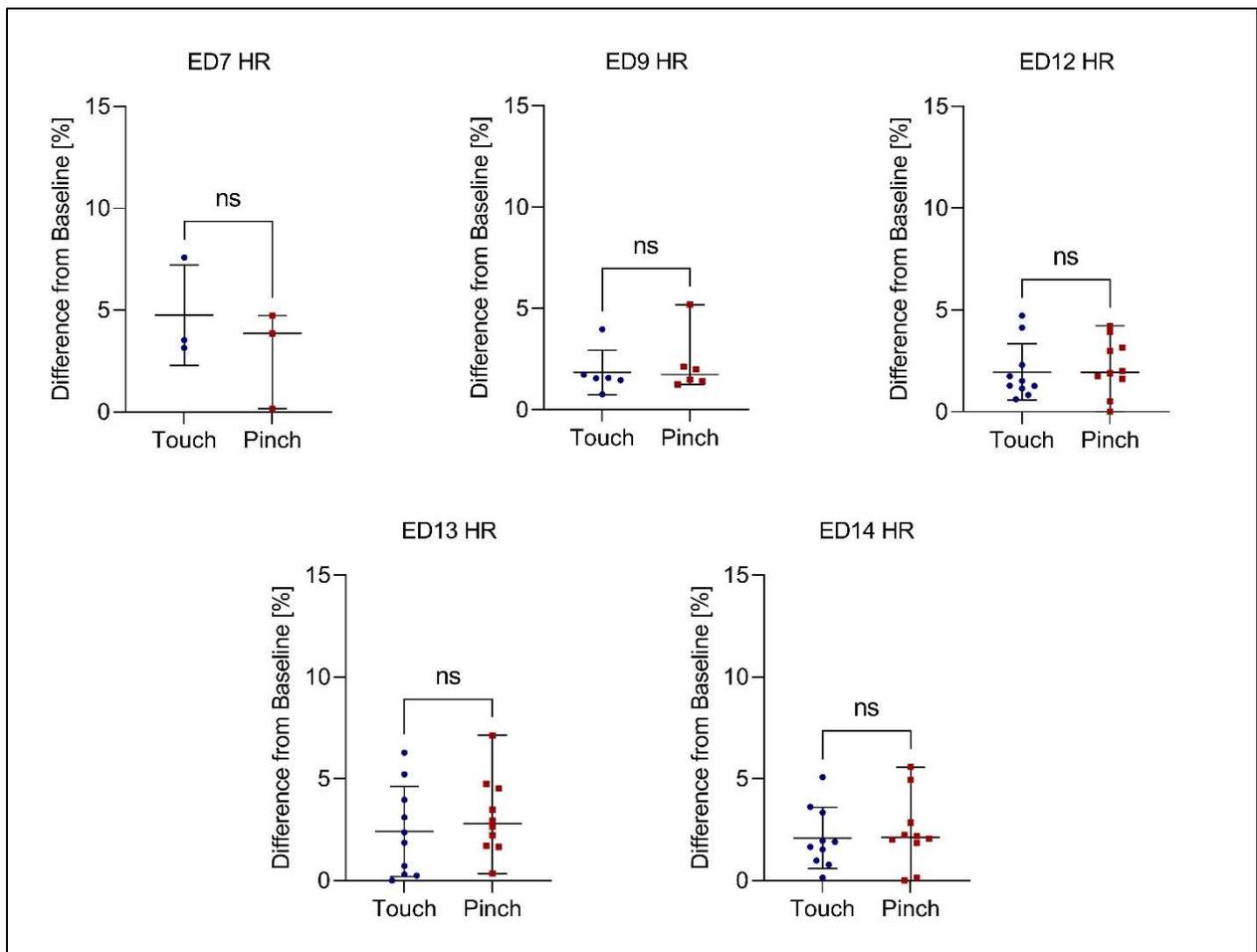


Abbildung 9 Prozentuale Abweichungen von der Baseline in der Herzfrequenz (HR) nach *Touch* und *Pinch* an den Bruttagen ED7 (n=3), ED9 (n=6) und ED12 bis ED14 (n=10). *t*-Differenzentest (normalverteilt) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht normalverteilt). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung. *ns* = kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

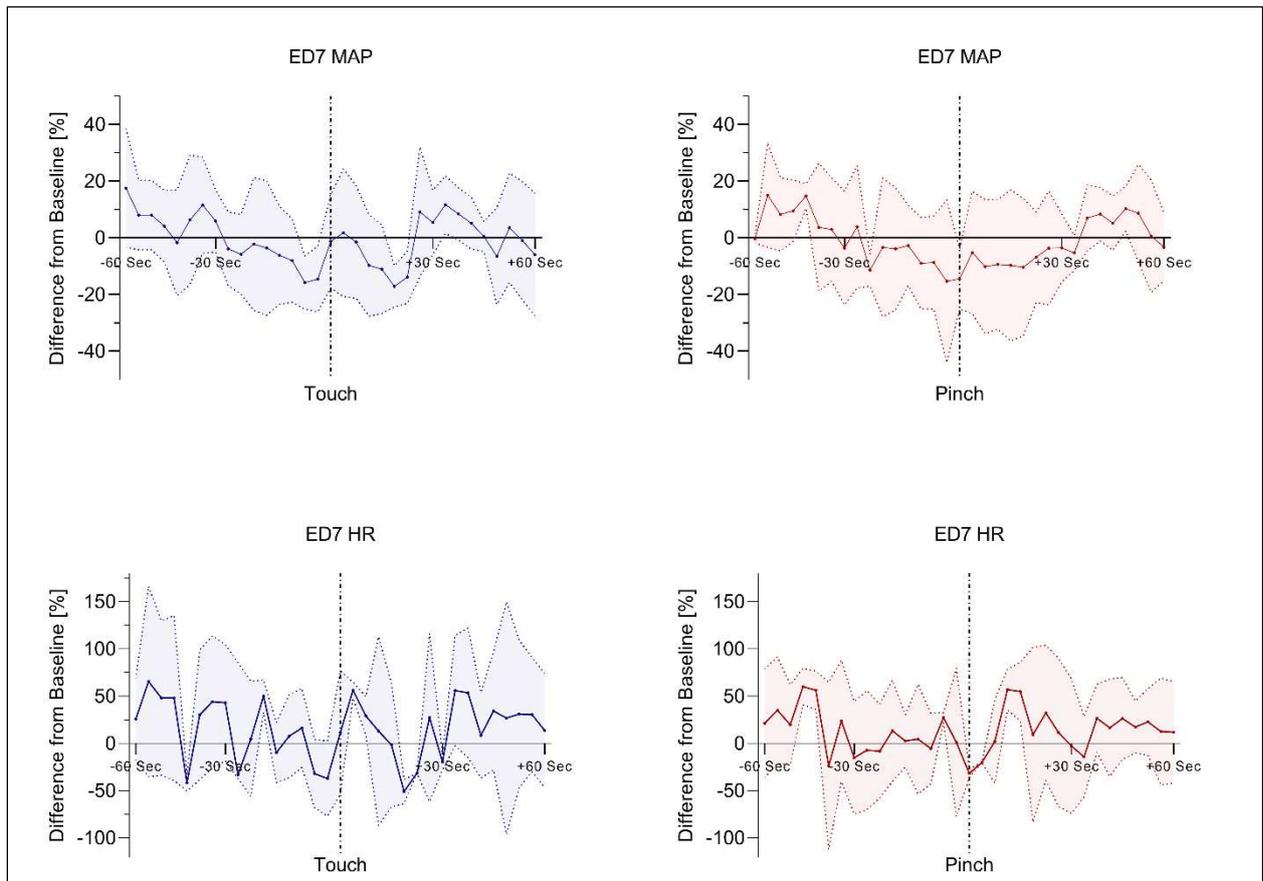


Abbildung 10 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Brutttag ED7 (n=3) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (shaded).

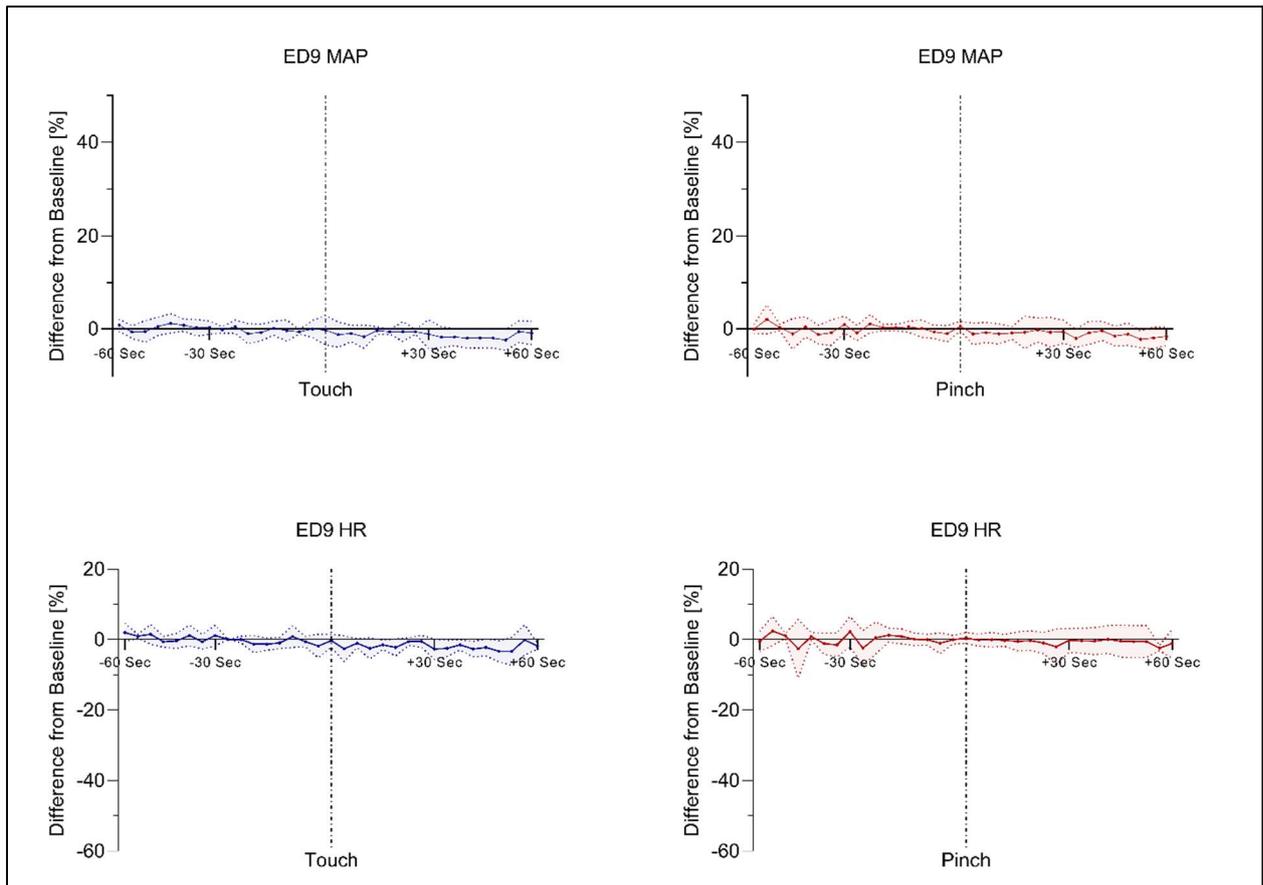


Abbildung 11 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED9 (n=6) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (shaded).

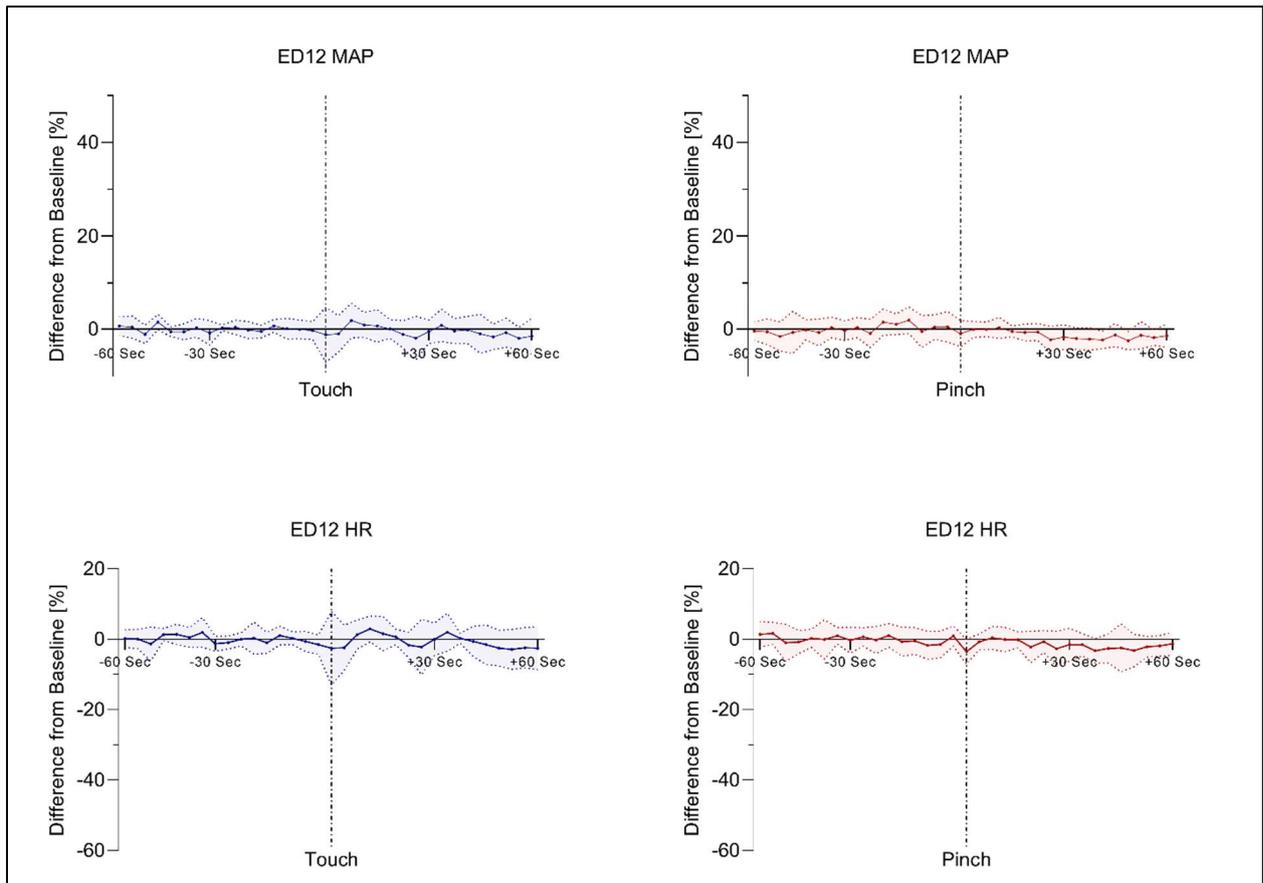


Abbildung 12 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED12 (n=6) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (*shaded*).

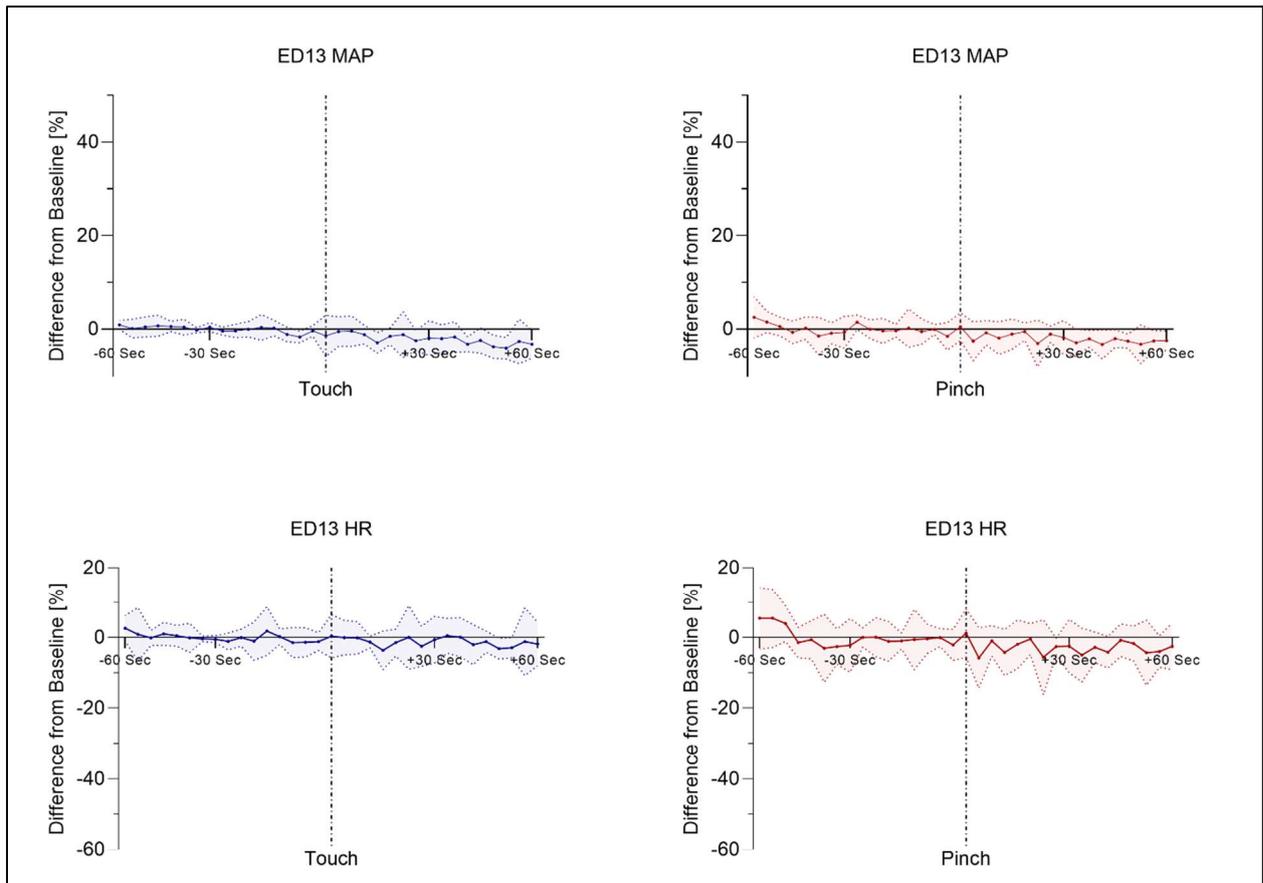


Abbildung 13 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Brutttag ED13 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (*shaded*).

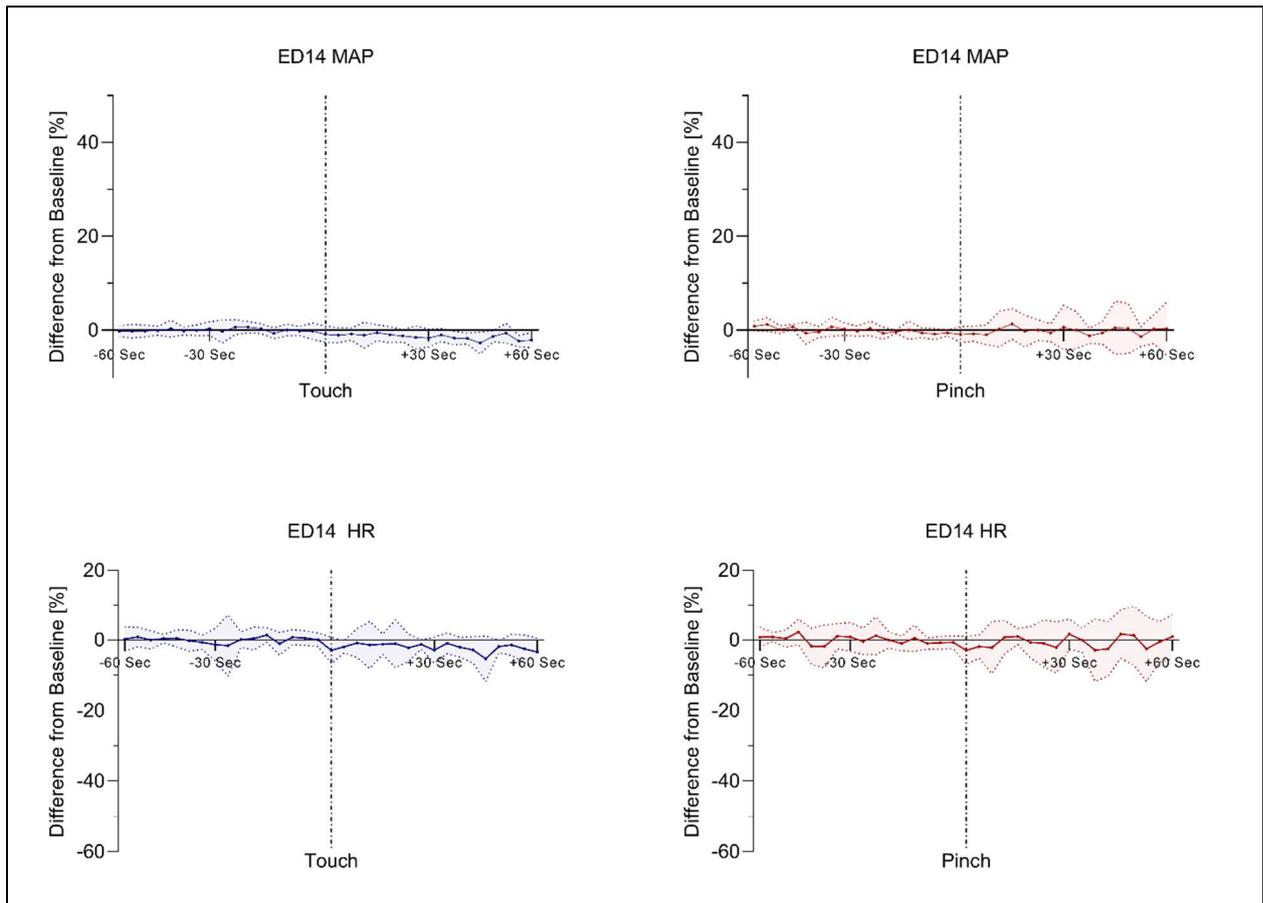


Abbildung 14 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED14 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (*shaded*).

Untersuchung der kardiovaskulären Reaktion auf einen noxischen Stimulus an ED15, ED16, ED17 und ED18

Embryonen an ED16 ($p = 0,0008$), ED17 ($p = 0,0020$) und ED18 ($p = 0,0048$) zeigten signifikante Veränderungen im MAP als Reaktion auf einen noxischen mechanischen Stimulus an der Schnabelbasis (*Pinch*) im Vergleich zur Negativkontrolle (*Touch*). ED18 zeigte die stärkste Reaktion im MAP mit einer Abweichung von $15,52 \pm 12,36$ % zur Baseline nach *Pinch*. Mit abnehmendem Alter wurden auch die gemessenen Reaktionen im MAP auf den *Pinch* schwächer und die Unterschiede zur Negativkontrolle (*Touch*) geringer. An ED15 zeigten nur noch vereinzelt Tiere einen Anstieg im MAP auf den *Pinch*, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen *Pinch* und *Touch* (Abbildung 15).

Signifikante Veränderungen in der HR als Reaktion auf den *Pinch* im Vergleich zu *Touch* konnten bei Embryonen an ED17 ($p = 0,0148$) und ED18 ($p = 0,0154$) festgestellt werden. Embryonen an ED18 zeigten auch hier den größten Anstieg in der HR mit einer Abweichung von $5,14 \pm 3,60$ % zur Baseline nach *Pinch*. An ED15 und ED16 wurde bei vereinzelt Tieren ein Anstieg in der

HR nach *Pinch* beobachtet, allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Pinch* und *Touch* festgestellt werden (Abbildung 16).

Als unmittelbare Reaktion auf den *Pinch* konnte vor allem an ED17 und ED18 ein perakuter Abfall der Herzfrequenz, gefolgt von einem Anstieg der HR, beobachtet werden. Der Abfall wurde bei 8/10 ED18-Embryonen und 3/10 ED17-Embryonen beobachtet. Der größte Abfall wurde bei Embryonen an ED18 verzeichnet, wobei die HR nach *Pinch* im Mittel über $9,50 \pm 6,02$ Sekunden um bis zu $-33,28 \% \pm 26,83$ abfiel. Nach *Touch* wurde bei den Embryonen kein HR-Abfall beobachtet (Abbildung 17 bis Abbildung 20).

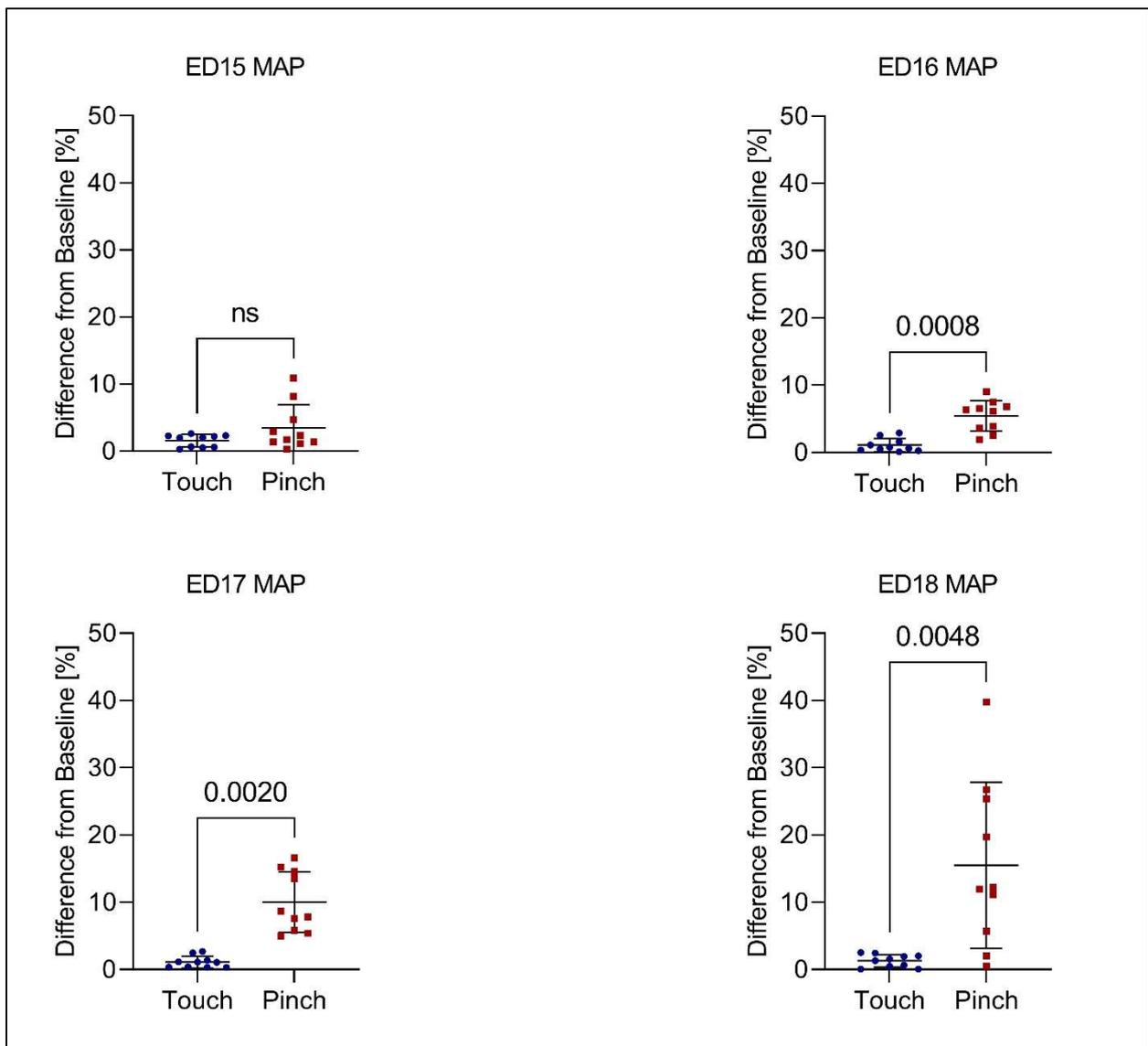


Abbildung 15 Prozentuale Abweichungen von der Baseline im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) nach *Touch* und *Pinch* an den Bruttagen ED15 bis ED18 (n=10). *t*-Differenzentest (normalverteilt) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht normalverteilt). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung. *p*-Werte angegeben, ns = kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

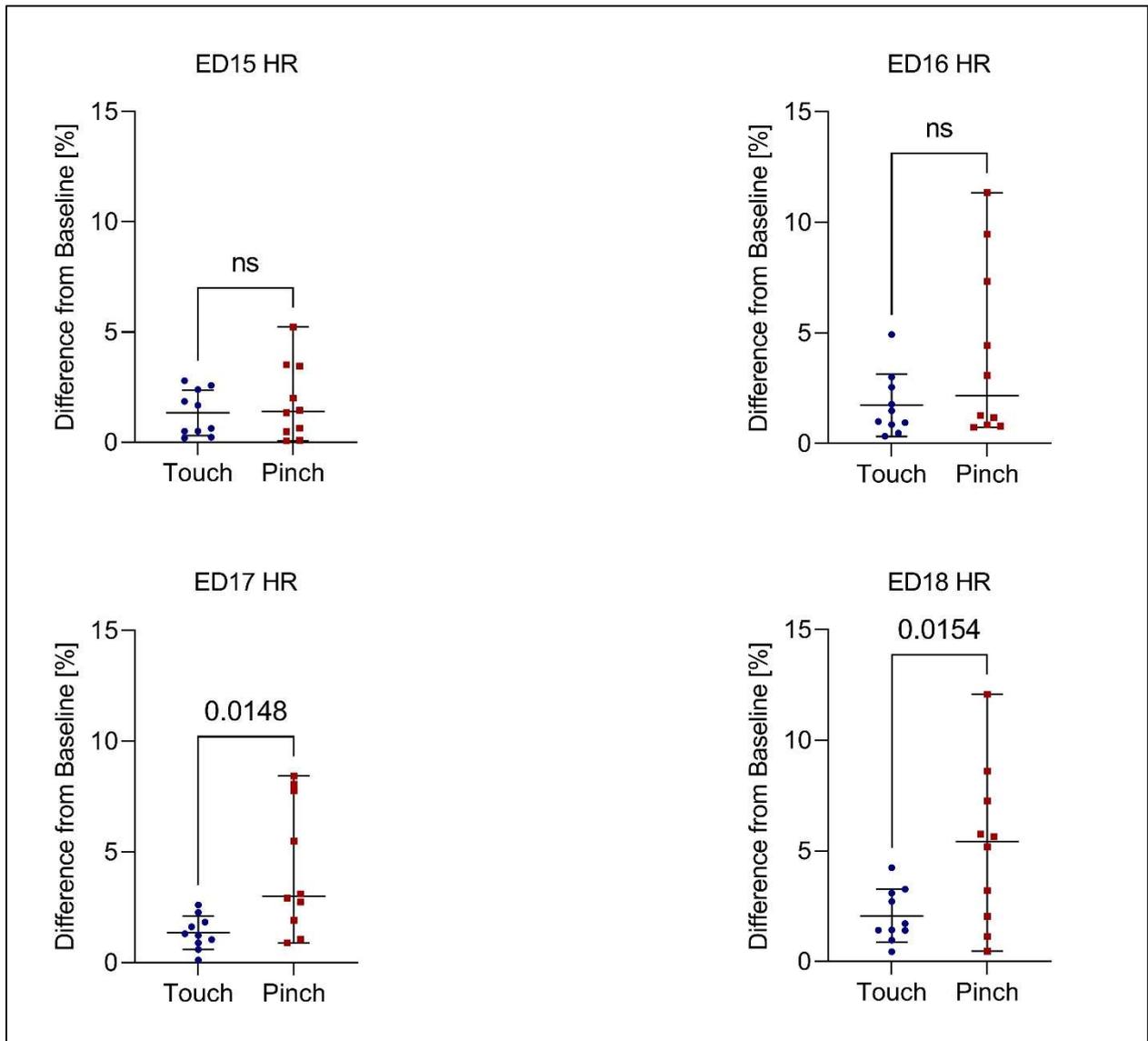


Abbildung 16 Prozentuale Abweichungen von der Baseline in der Herzfrequenz (HR) nach *Touch* und *Pinch* an den Bruttagen ED15 bis ED18 (n=10). *t*-Differenzentest (*normalverteilt*) bzw. *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test* (*nicht normalverteilt*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung. *p*-Werte angegeben, *ns* = kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

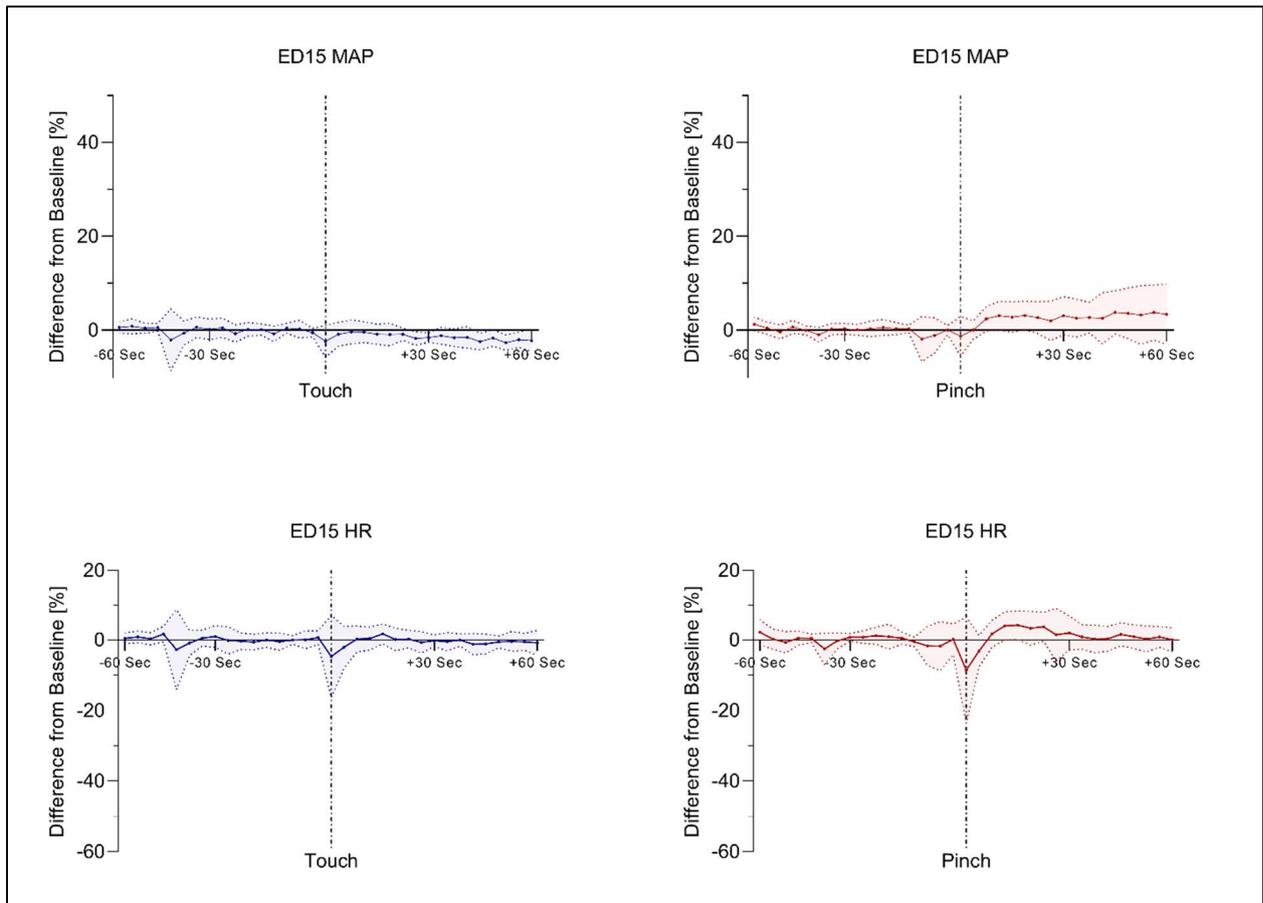


Abbildung 17 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED15 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (*shaded*).

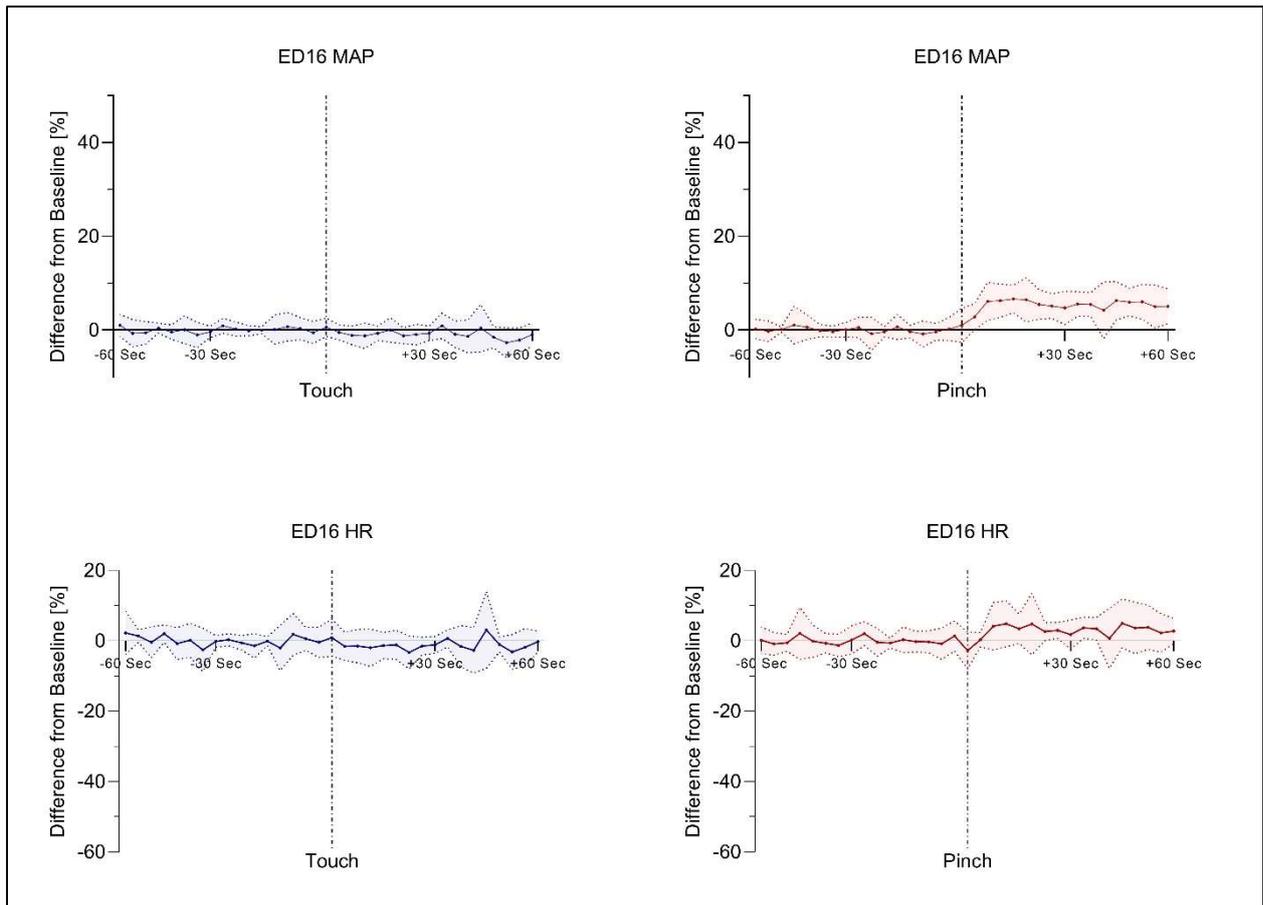


Abbildung 18 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED16 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (*shaded*).

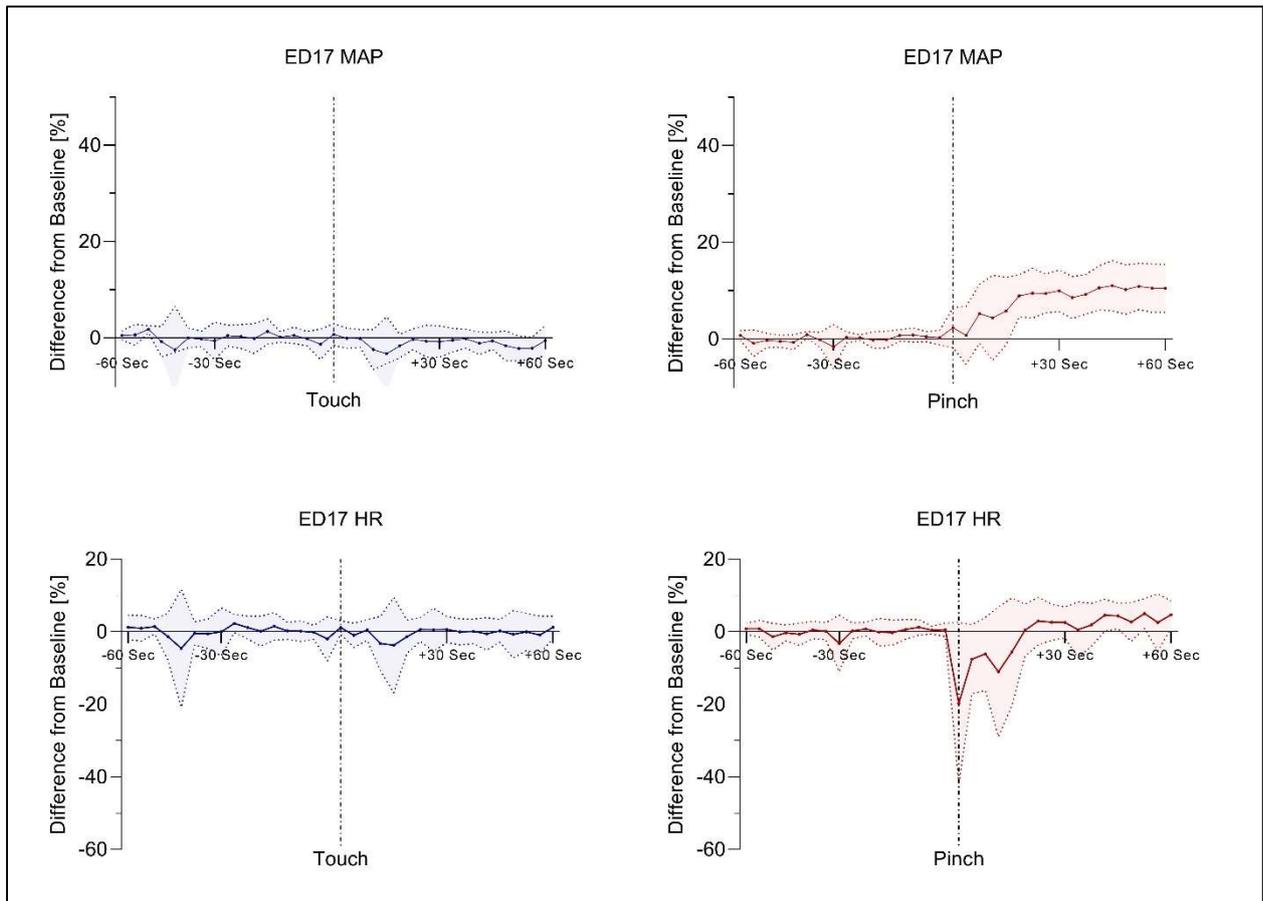


Abbildung 19 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Brutttag ED17 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (shaded).

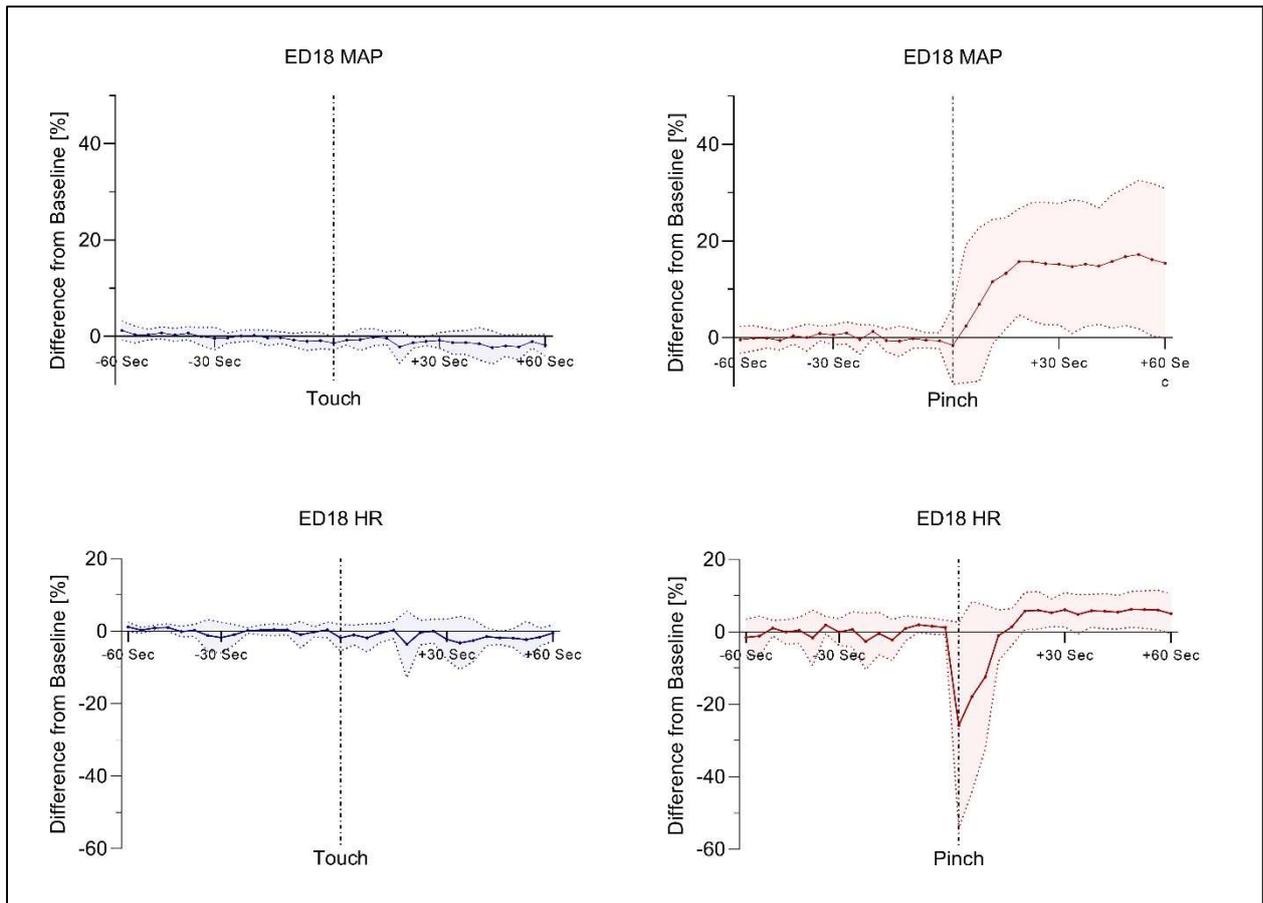


Abbildung 20 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) zur mittleren Baseline am Bruttag ED18 (n=10) über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung (shaded).

Untersuchung der kardiovaskulären Reaktion auf einen noxischen Stimulus nach Verabreichung eines Lokalanästhetikums an ED18

Die Applikation des Lokalanästhetikums Lidocain konnte die Reaktionen im MAP nach *Pinch* signifikant reduzieren. Die Versuchsgruppe, die kein Lokalanästhetikum erhielt (*ED18 w/o Lido Pinch*), zeigte im Vergleich zu den Versuchsgruppen *ED18 w/ Lido Touch* ($p = 0,0031$), *ED18 w/ Lido Pinch* ($p = 0,0397$) und *ED18 w/o Lido Touch* ($p = 0,0007$) die größten Abweichungen im MAP nach Stimulus. Im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Lokalanästhesie (*ED18 w/o Lido Pinch*), die im MAP eine Abweichung von $15,52 \pm 12,36$ % zur Baseline nach *Pinch* zeigte, konnte die Reaktion im MAP auf den *Pinch* bei der Versuchsgruppe, die ein Lokalanästhetikum erhielt (*ED18 w/ Lido Pinch*), auf eine Abweichung von $5,00 \pm 3,42$ % zur Baseline reduziert werden (Abbildung 21).

Auch die Veränderungen der HR nach *Pinch* konnten durch die Applikation von Lidocain leicht reduziert werden. Ein signifikanter Unterschied der Gruppe ohne Lokalanästhesie (*ED18 w/o Lido Pinch*) wurde allerdings nur zur Versuchsgruppe *ED18 w/ Lido Touch* ($p = 0,0097$) festgestellt. Der als Reaktion auf den *Pinch* beobachtete HR-Abfall wurde bei keinem

der Embryonen beobachtet, während in der Versuchsgruppe ohne Lokalanästhesie (*ED18 w/o Lido Pinch*) 8/10 Embryonen diese Reaktion zeigten (Abbildung 22 und Abbildung 23).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Infiltrationsanästhesie mit dem Lokalanästhetikum Lidocain die kardiovaskulären Reaktionen, insbesondere den MAP, als Antwort auf einen noxischen Stimulus (*Pinch*) signifikant reduzieren kann. Demnach können die kardiovaskulären Veränderungen nach *Pinch* in den Versuchsgruppen, die keine Lokalanästhesie erhalten haben, als nozizeptive Reaktion interpretiert werden.

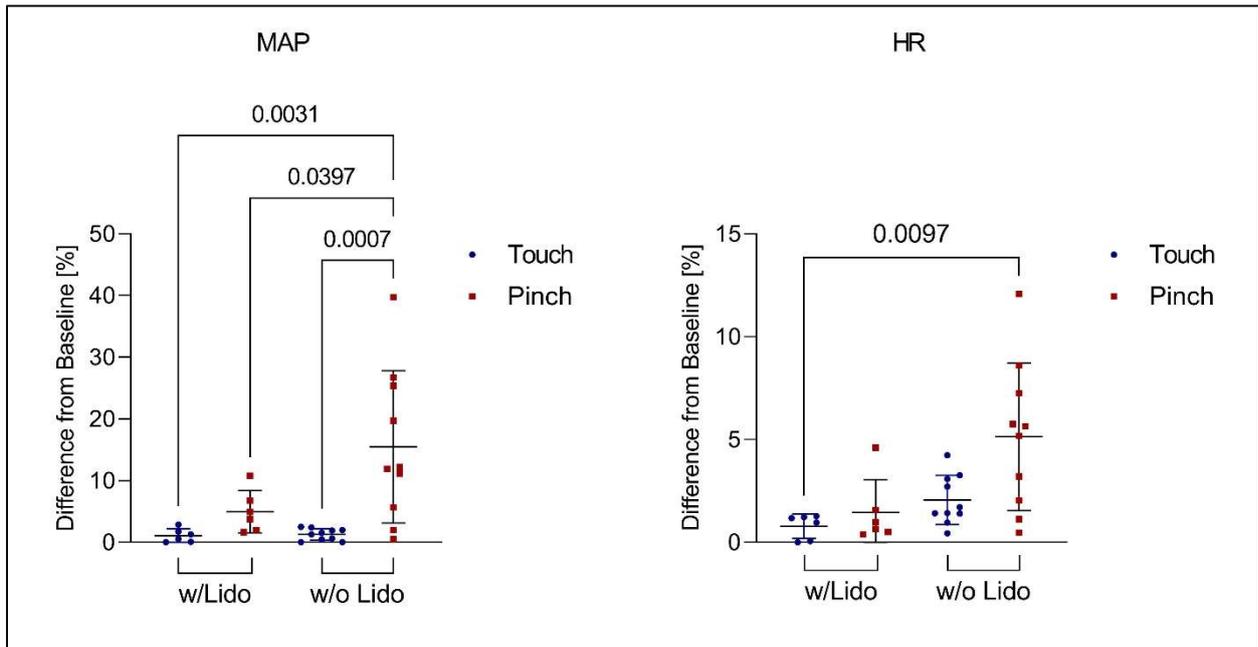


Abbildung 21 Mittelwerte \pm SD des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) sowie der Herzfrequenz (HR) bei Embryonen an ED18, die zuvor je nach Versuchsgruppe eine (*ED18 w/ Lido*; n=6) oder keine (*ED18 w/o Lido*; n=10) Lidocain-Injektion in die Schnabelbasis erhalten haben, nach einem Stimulus (*Pinch*, *Touch*). Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung. p-Werte angegeben.

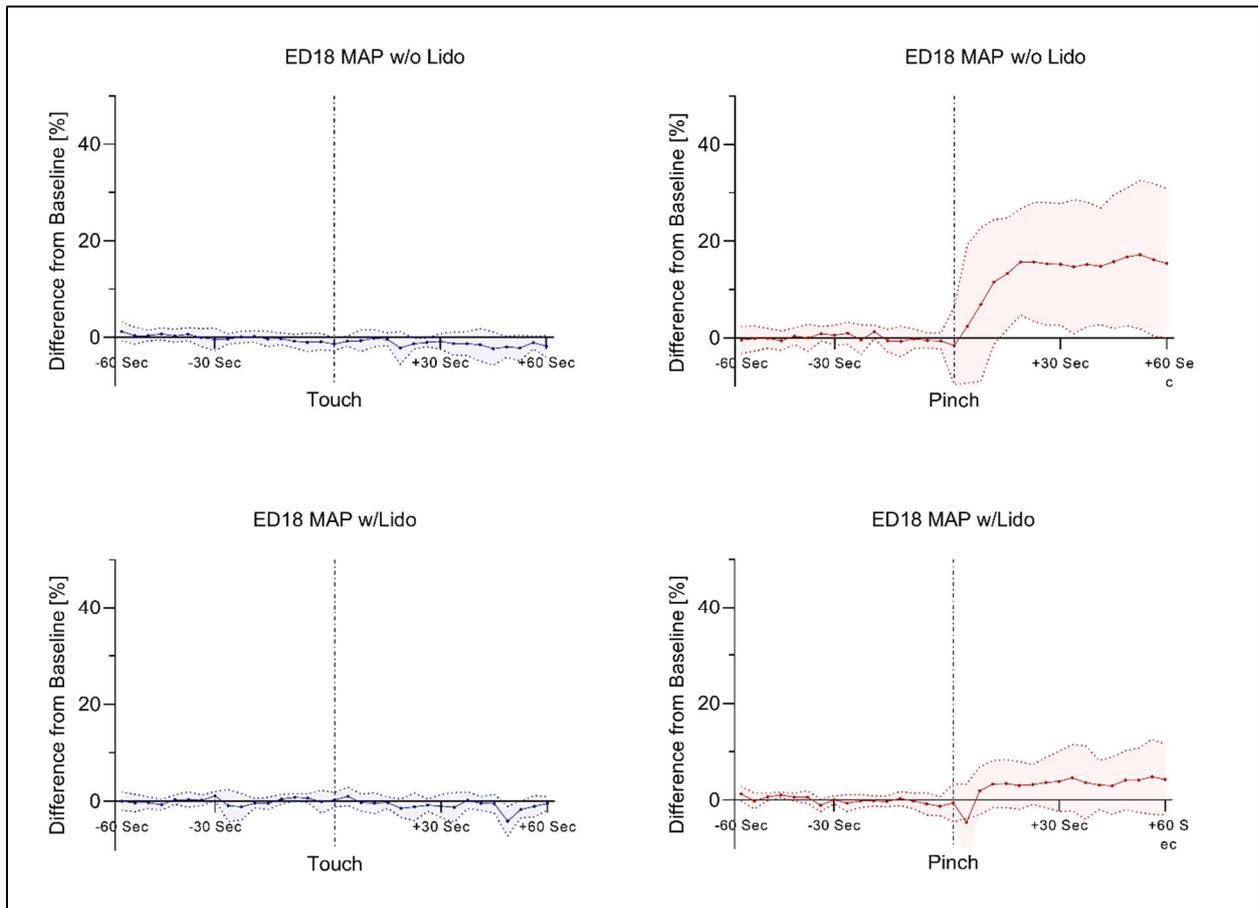


Abbildung 22 Prozentuale Abweichungen im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) zum Mittelwert der Baseline am Bruttag ED18 über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*ED18 w/ und w/o Lido, Touch und Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm SD (shaded).

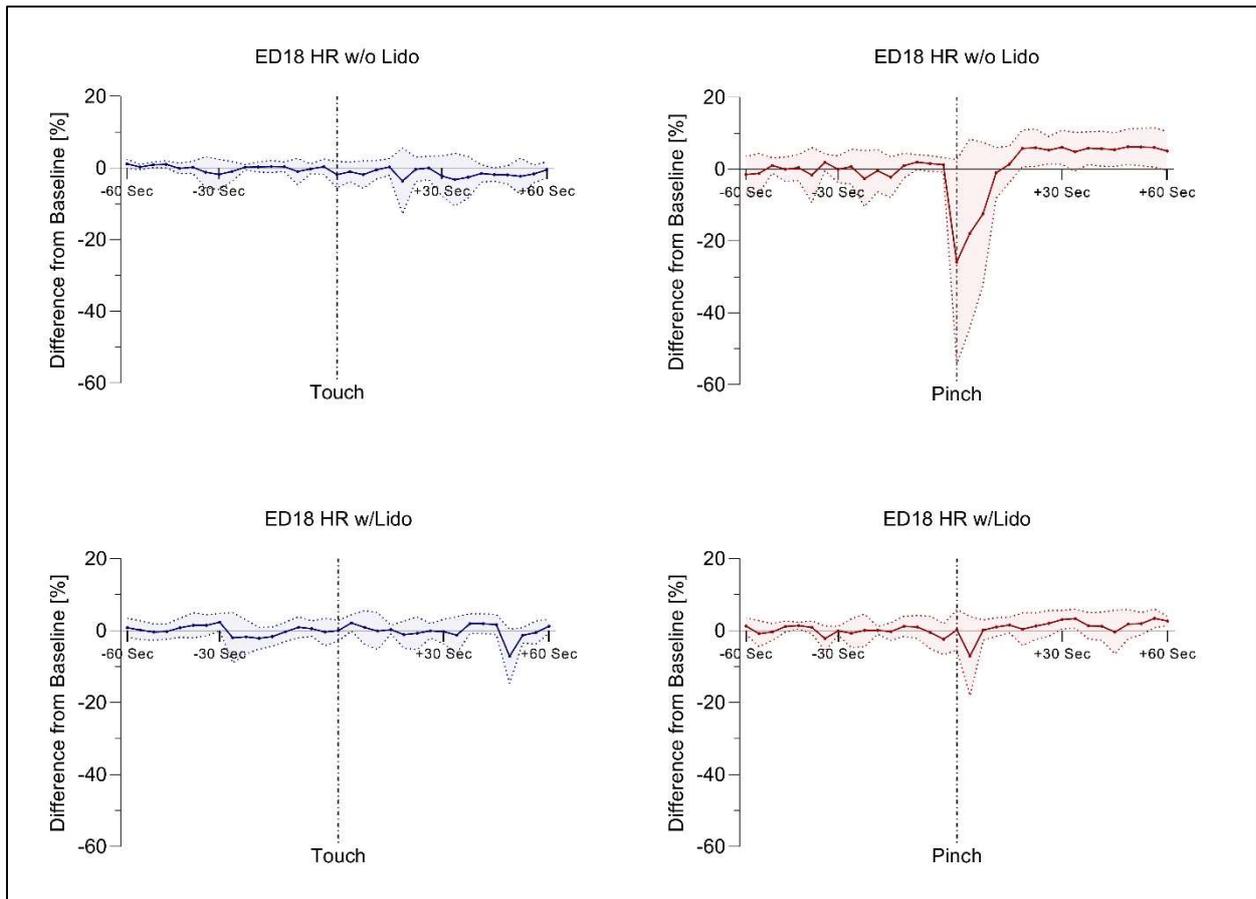


Abbildung 23 Prozentuale Abweichungen in der Herzfrequenz (HR) zum Mittelwert der Baseline am Bruttag ED18 über die Zeit. Erhebung der Werte alle 4 Sekunden über eine Minute vor und eine Minute nach Stimulation (*ED18 w/ und w/o Lido, Touch* und *Pinch*). Darstellung als Mittelwert \pm SD (shaded).

3.1.2.2. Verhaltensparameter

Untersuchung der Verhaltensreaktion auf einen noxischen Stimulus an ED9, ED12, ED13, ED14, ED15, ED16, ED17 und ED18 mittels DeepLabCut (DLC)

ED9 und ED12

Da es durch den *Pinch* an ED9 und ED12 zu einer Veränderung am Schnabel und somit einer veränderten Lage des Schnabels kam, war eine Auswertung der Schnabelbewegungen mit DLC für die beiden Bruttage nicht möglich. Für *Movement Elbow*, *Movement Eyecorner*, *Movement Tarsus* konnte an ED9 keine signifikante Veränderung des Verhaltens nach *Pinch* und *Touch* oder zwischen der Baseline und den Zeitintervallen nach den Stimuli beobachtet werden (Abbildung 24). Für Embryonen an ED12 konnten signifikante Veränderungen in Bezug auf *Movement Eyecorner* und *Movement Metatarsus* im Intervall 30-60 bzw. 90-120 Sekunden nach *Pinch* im Vergleich zu *Touch* gefunden werden (Abbildung 25). Aufgrund des hohen p-Werts (*Movement Eyecorner*: $p = 0,0372$; *Movement Metatarsus*: $p = 0,0343$), keinem signifikanten Unterschied zur Baseline, dem späten Zeitpunkt des Auftretens und der Möglichkeit, dass Körperbewegungen bei Hühnerembryonen auch reizunabhängig vorkommen können, wurde diese Beobachtung zwar als signifikant, jedoch nicht als biologisch relevant erachtet.

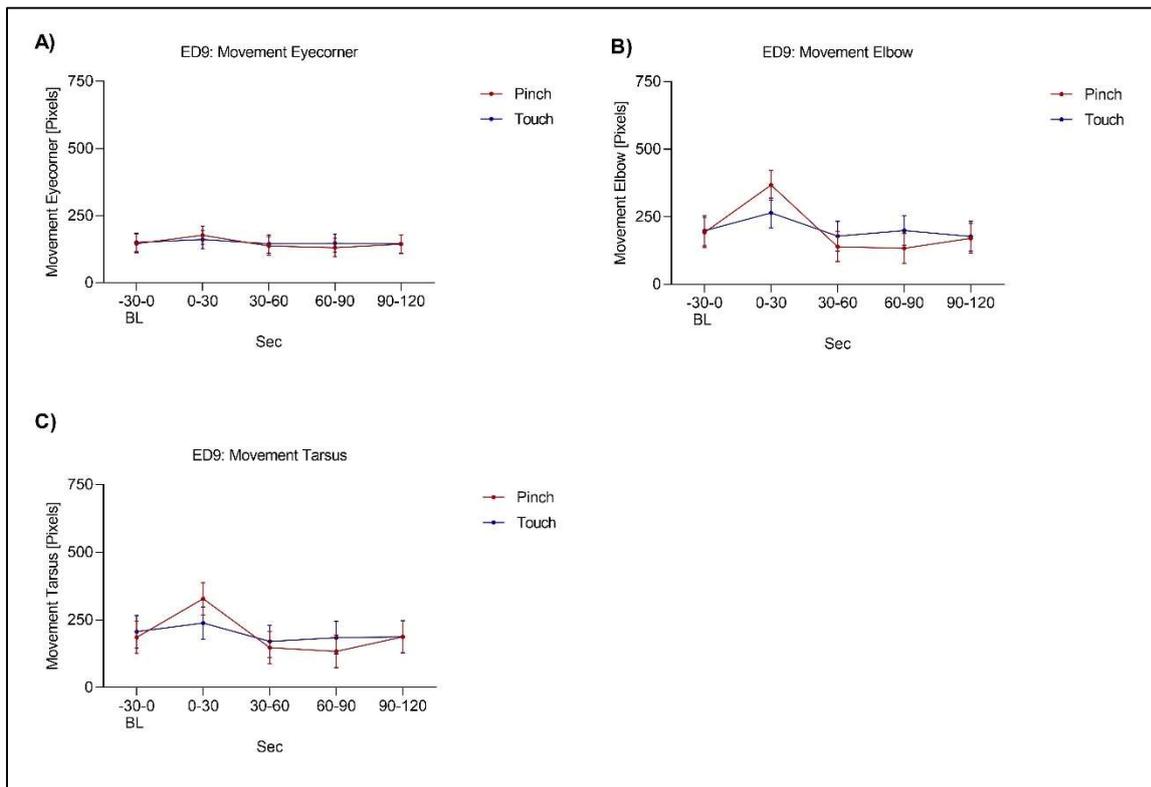


Abbildung 24 Bewegungen des medialen Augenwinkels (A), Ellbogens (B) und Tarsus bzw. Metatarsus (C) von Embryonen an ED9. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90, 90-120 Sekunden.

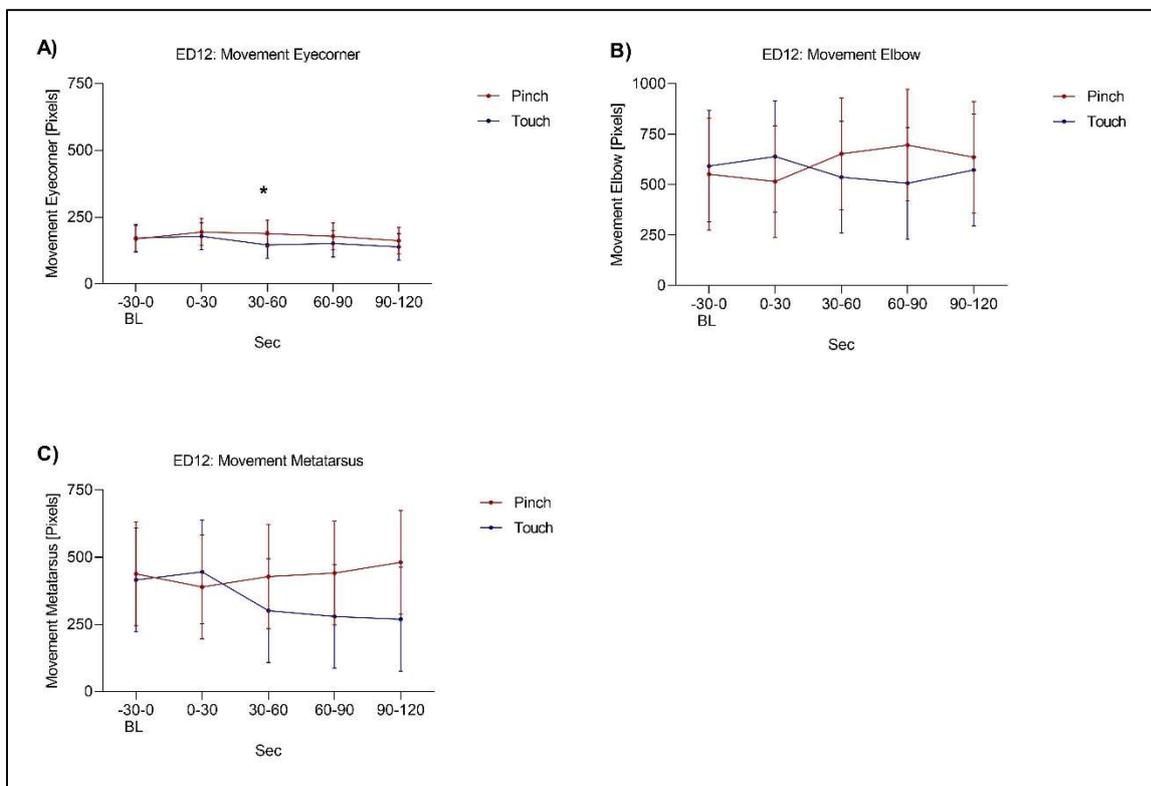


Abbildung 25 Bewegungen des medialen Augenwinkels (A), Ellbogens (B) und Tarsus bzw. Metatarsus (C) von Embryonen an ED12. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90, 90-120 Sekunden.

ED13 und ED14

An ED13 und ED14 waren keine signifikanten Unterschiede in den Schnabelbewegungen zwischen *Pinch* und *Touch* messbar (Abbildung 26 und Abbildung 27).

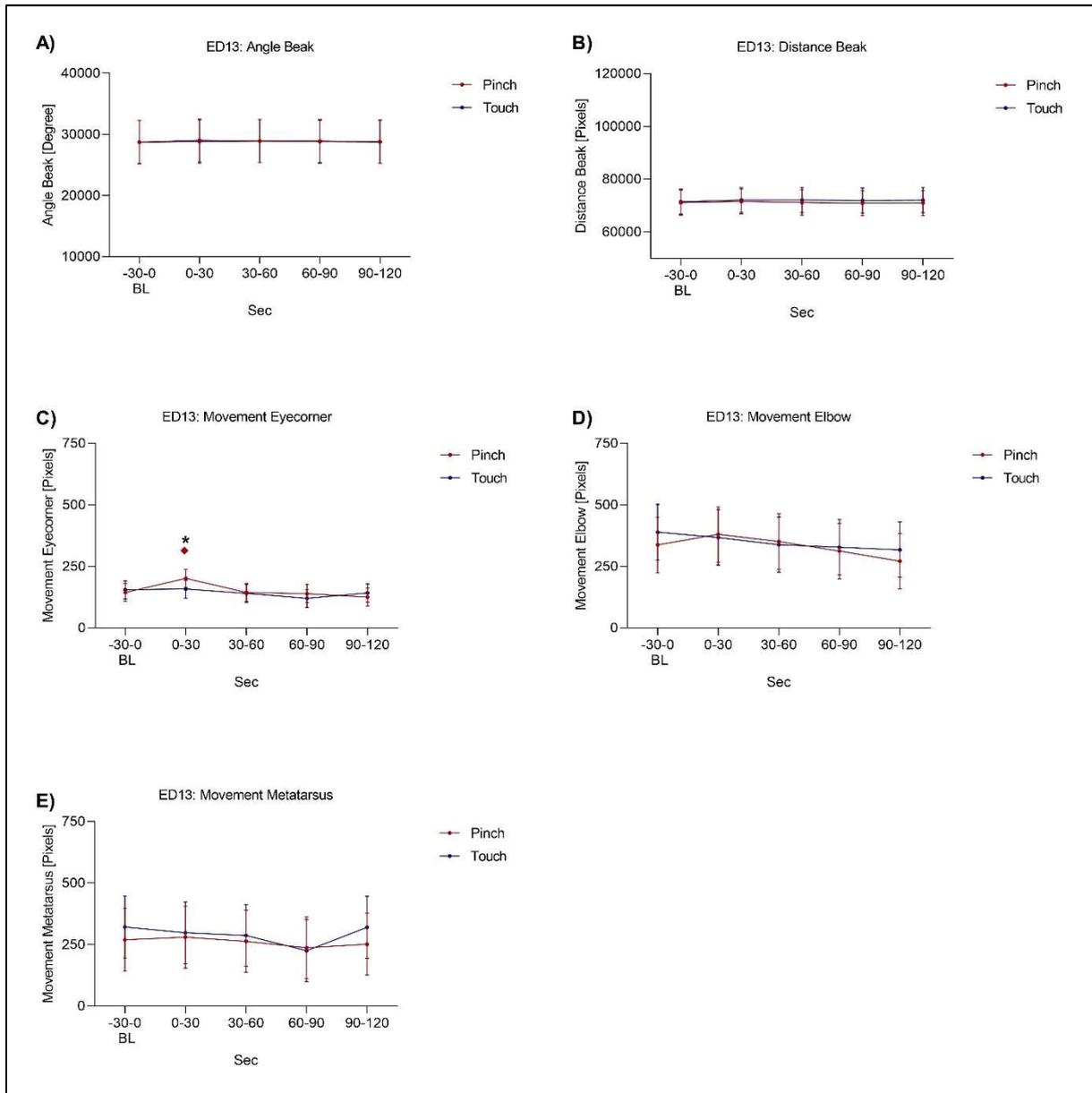


Abbildung 26 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen an ED13. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor und nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): ◆ $p \leq 0,05$, ◆◆ $p < 0,01$, ◆◆◆ $p < 0,001$.

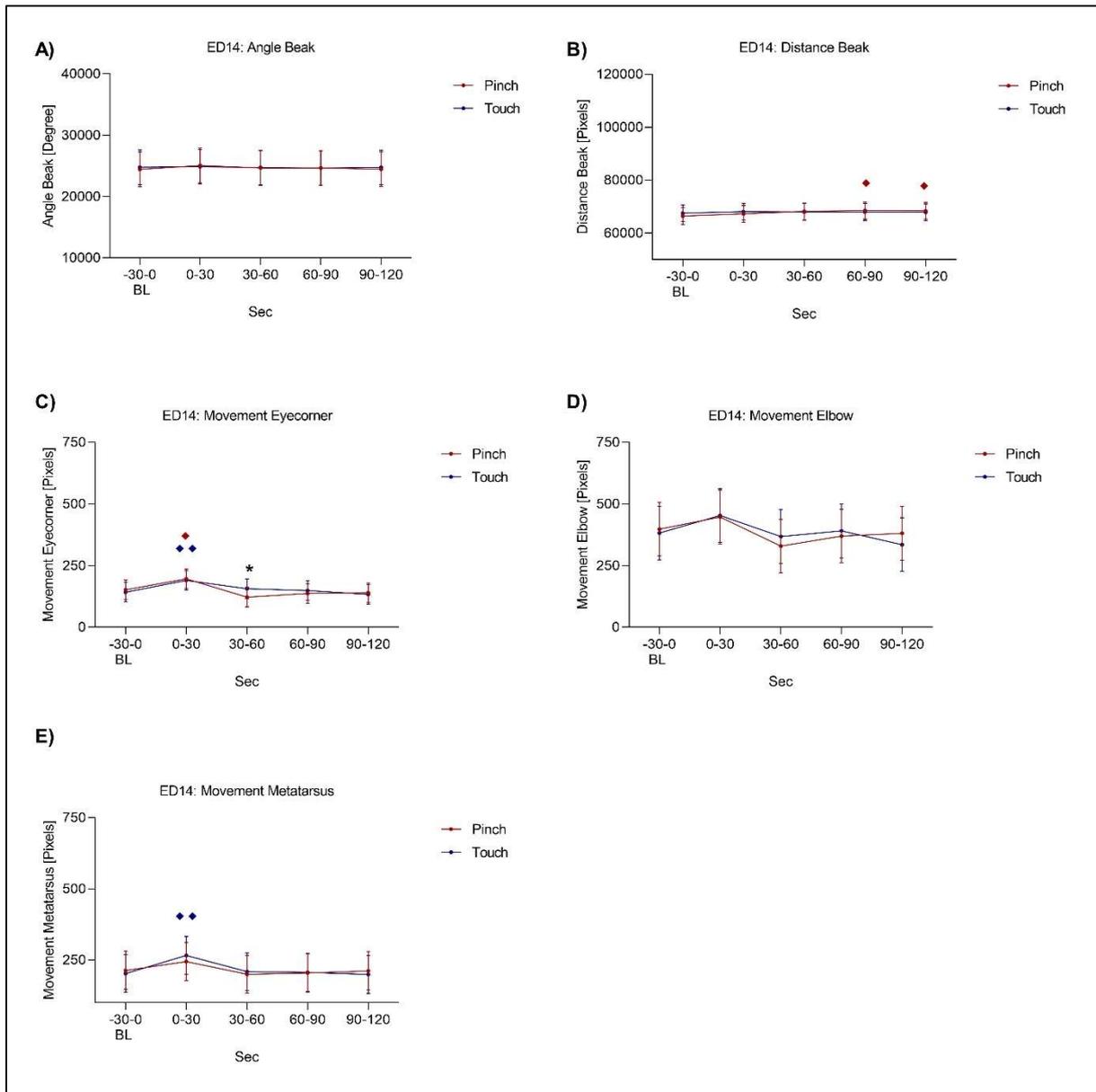


Abbildung 27 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen an ED14. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor und nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): \blacklozenge $p \leq 0,05$, $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,01$, $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,001$.

ED15 bis ED18

An den Bruttagen ED15 bis ED18 stellten die beiden Parameter, die zur Evaluierung der Schnabelbewegungen erhoben wurden, *Angle Beak* und *Distance Beak*, die aussagekräftigsten Verhaltensweisen nach *Pinch* dar. Beide Parameter wiesen an allen Bruttagen einen signifikanten Unterschied in den ersten 30 Sekunden nach *Pinch* im Vergleich zur Baseline ($p < 0,0001$) auf. Zusätzlich konnte im Zeitraum 0-30 Sekunden an allen Bruttagen nach dem jeweiligen Stimulus ein signifikanter Unterschied zwischen *Pinch* und *Touch* ($p < 0,0001$) festgestellt werden. Auch

in den nachfolgenden Zeitintervallen konnten signifikante Veränderungen in der *Pinch*-Gruppe beobachtet werden (siehe Abbildung 28 bis Abbildung 31).

In den ersten 30 Sekunden nach *Pinch* zeigten sich mit zunehmendem Alter auch in den Bewegungen des Kopfes und des Körpers (*Movement Eyecorner*, *Movement Elbow*, *Movement Metatarsus*) signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 28 bis Abbildung 31).

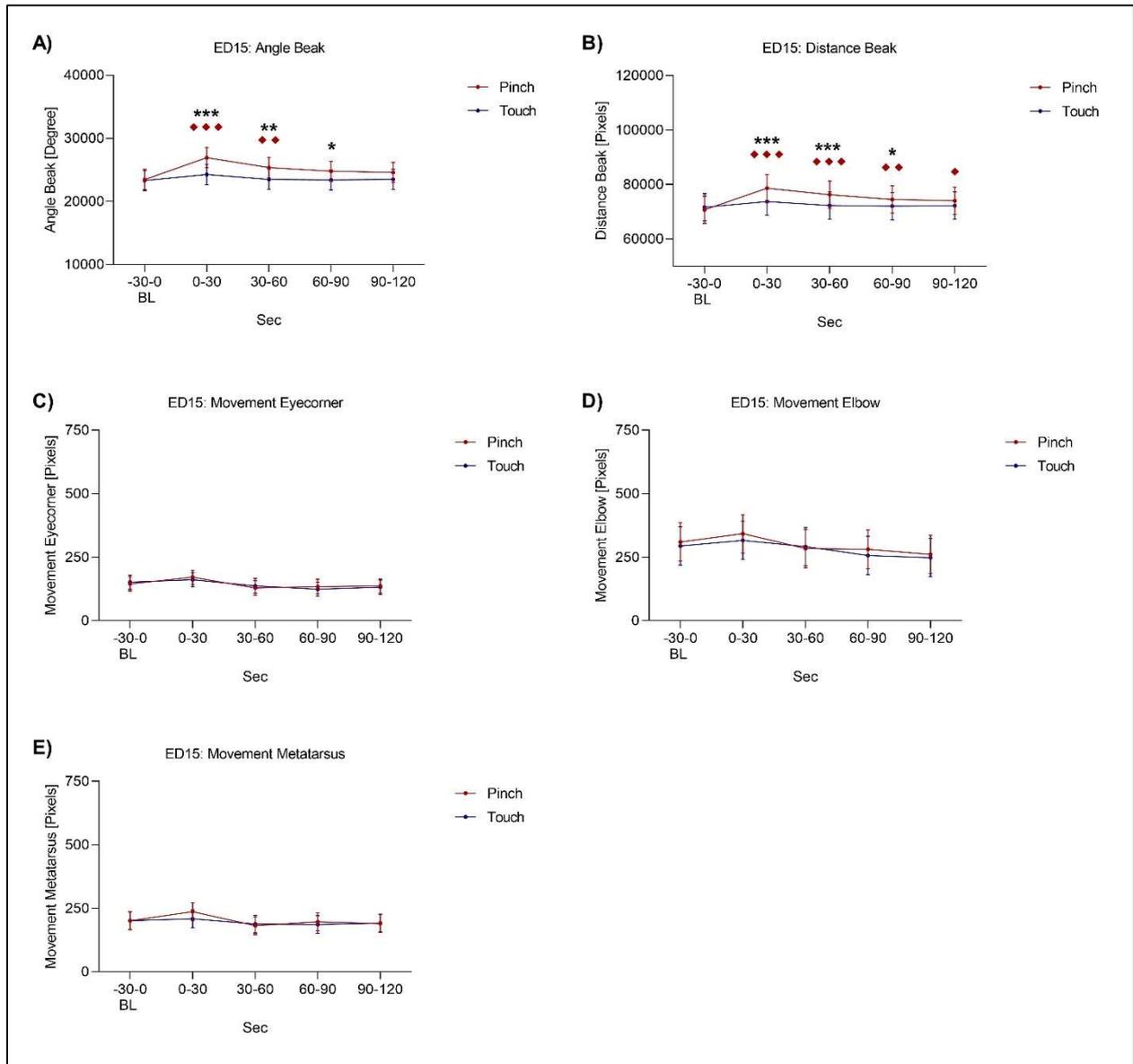


Abbildung 28 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen am Brutttag ED15. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor bzw. nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): \blacklozenge $p \leq 0,05$, $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,01$, $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,001$.

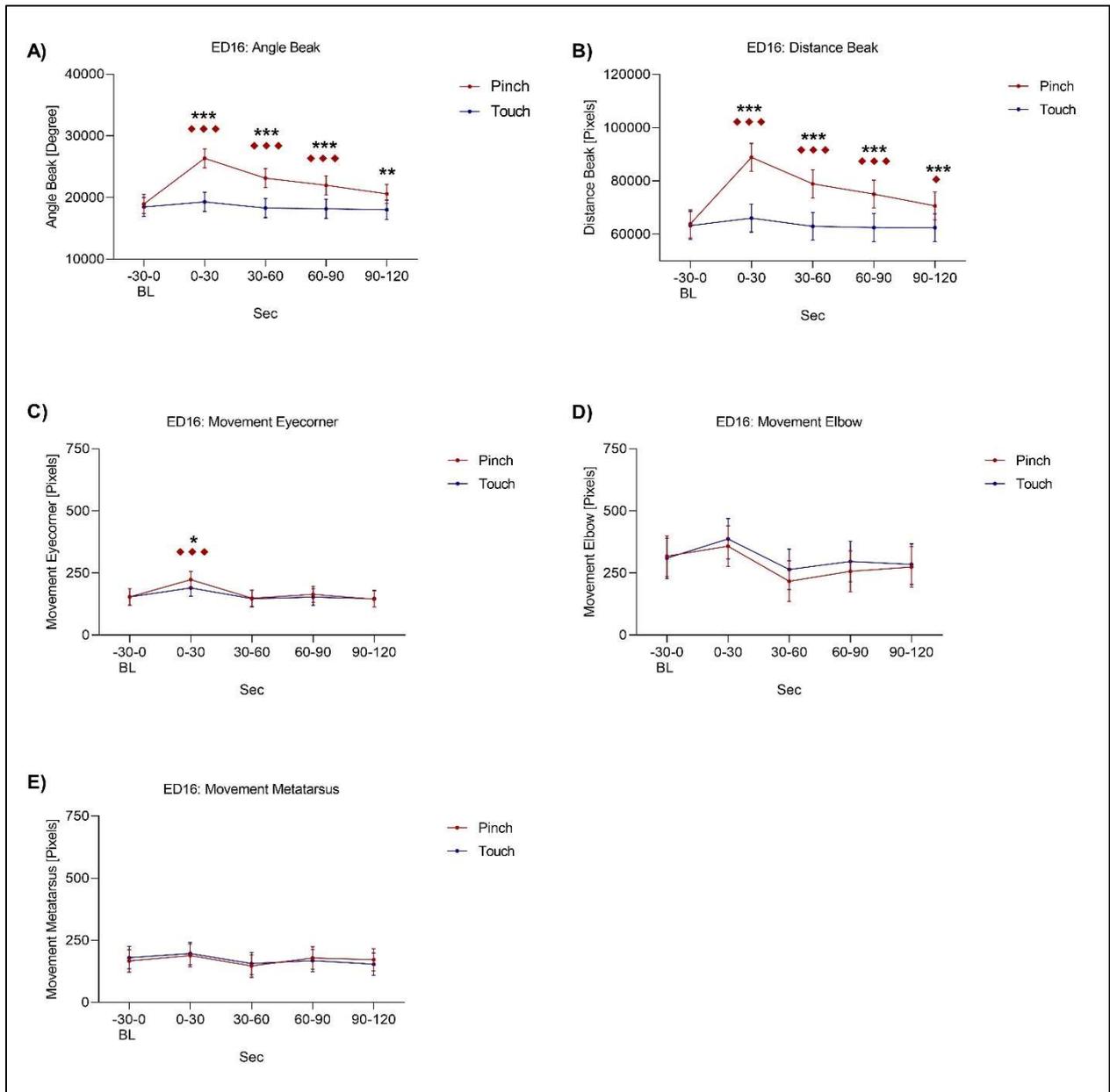


Abbildung 29 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen am Bruttag ED16. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor bzw. nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): ♦ $p \leq 0,05$, ♦♦ $p < 0,01$, ♦♦♦ $p < 0,001$.

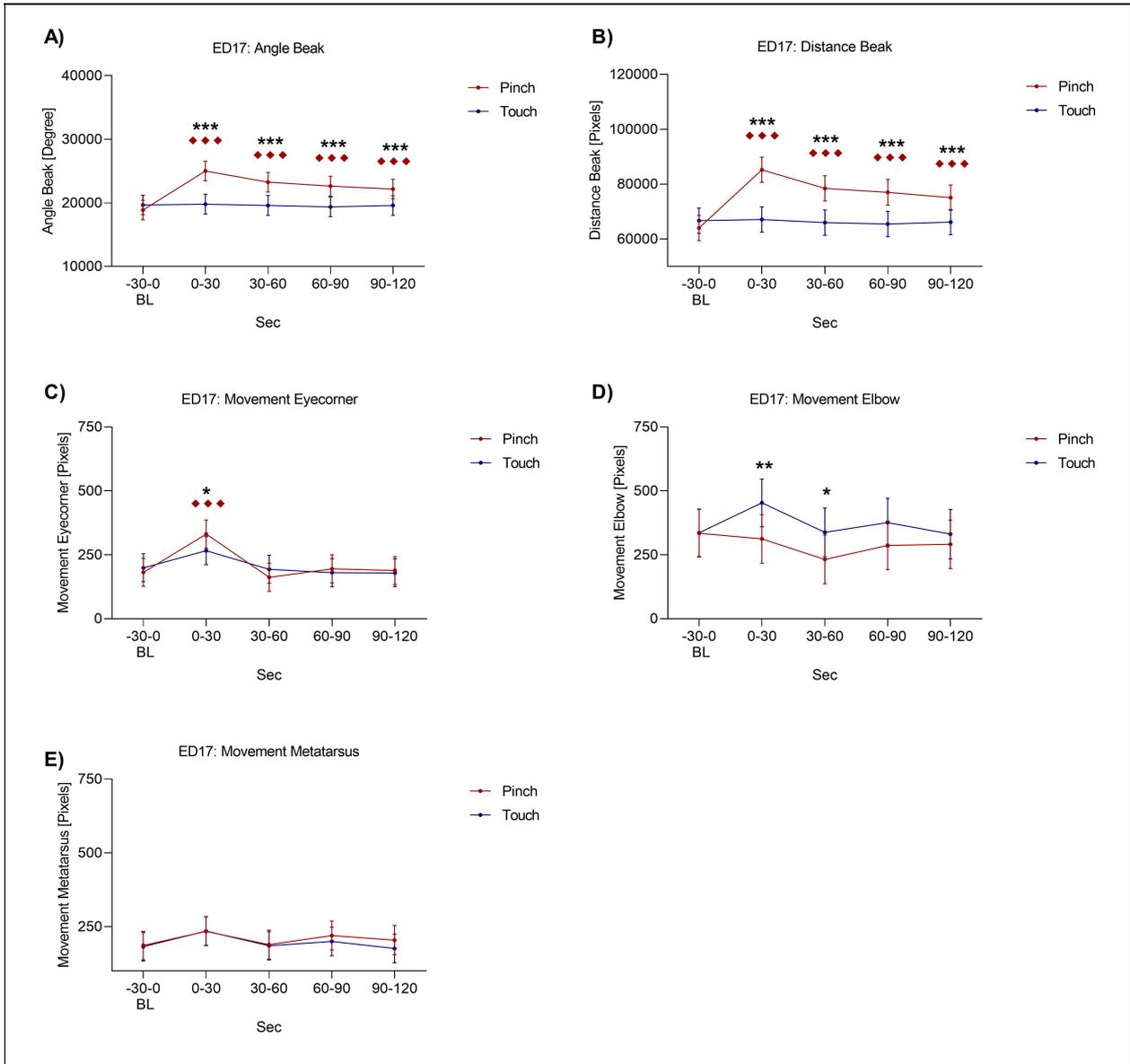


Abbildung 30 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen am Bruttag ED17. Darstellung des Mittelwerts (emmean) ± 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor bzw. nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): ♦ $p \leq 0,05$, ♦♦ $p < 0,01$, ♦♦♦ $p < 0,001$.

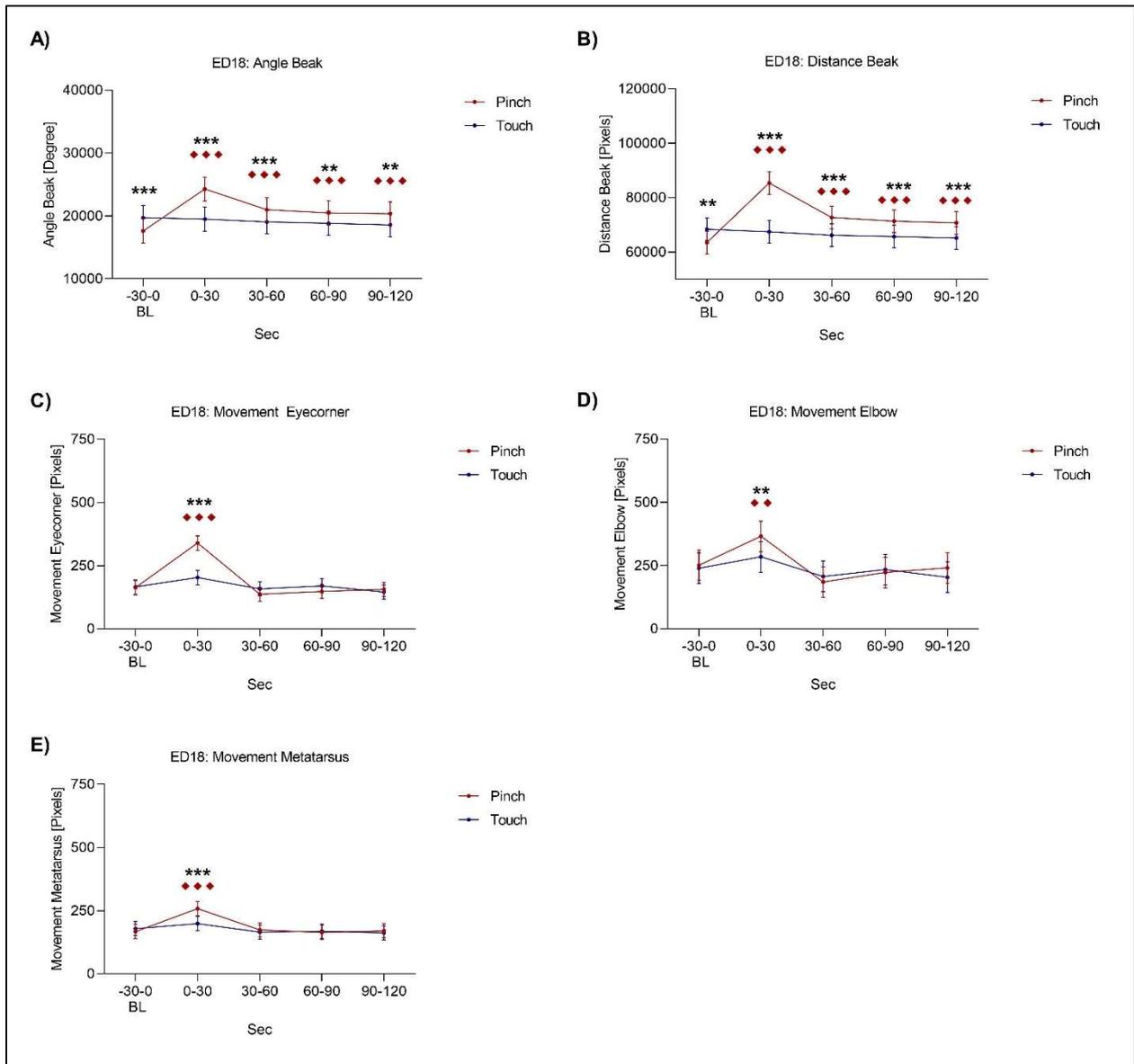


Abbildung 31 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie Bewegungen von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen am Brutttag ED18. Darstellung des Mittelwerts (emmean) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor bzw. nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): ◆ $p \leq 0,05$, ◆◆ $p < 0,01$, ◆◆◆ $p < 0,001$.

ED18 Lidocain

Für Embryonen an ED18, die mit dem Lokalanästhetikum Lidocain behandelt wurden, wurde ein signifikanter Anstieg der Parameter *Angle Beak* und *Distance Beak* in den ersten 30 Sekunden nach *Pinch* im Vergleich zu Baseline ($p < 0,0001$) und zu *Touch* ($p < 0,0001$) beobachtet (Abbildung 32).

In den Parametern *Movement Eyecorner*, *Movement Elbow*, *Movement Metatarsus* konnten zu keinem Zeitpunkt nach Stimulus signifikante Unterschiede zwischen den zeitlichen Intervallen oder zwischen *Pinch* und *Touch* verzeichnet werden.

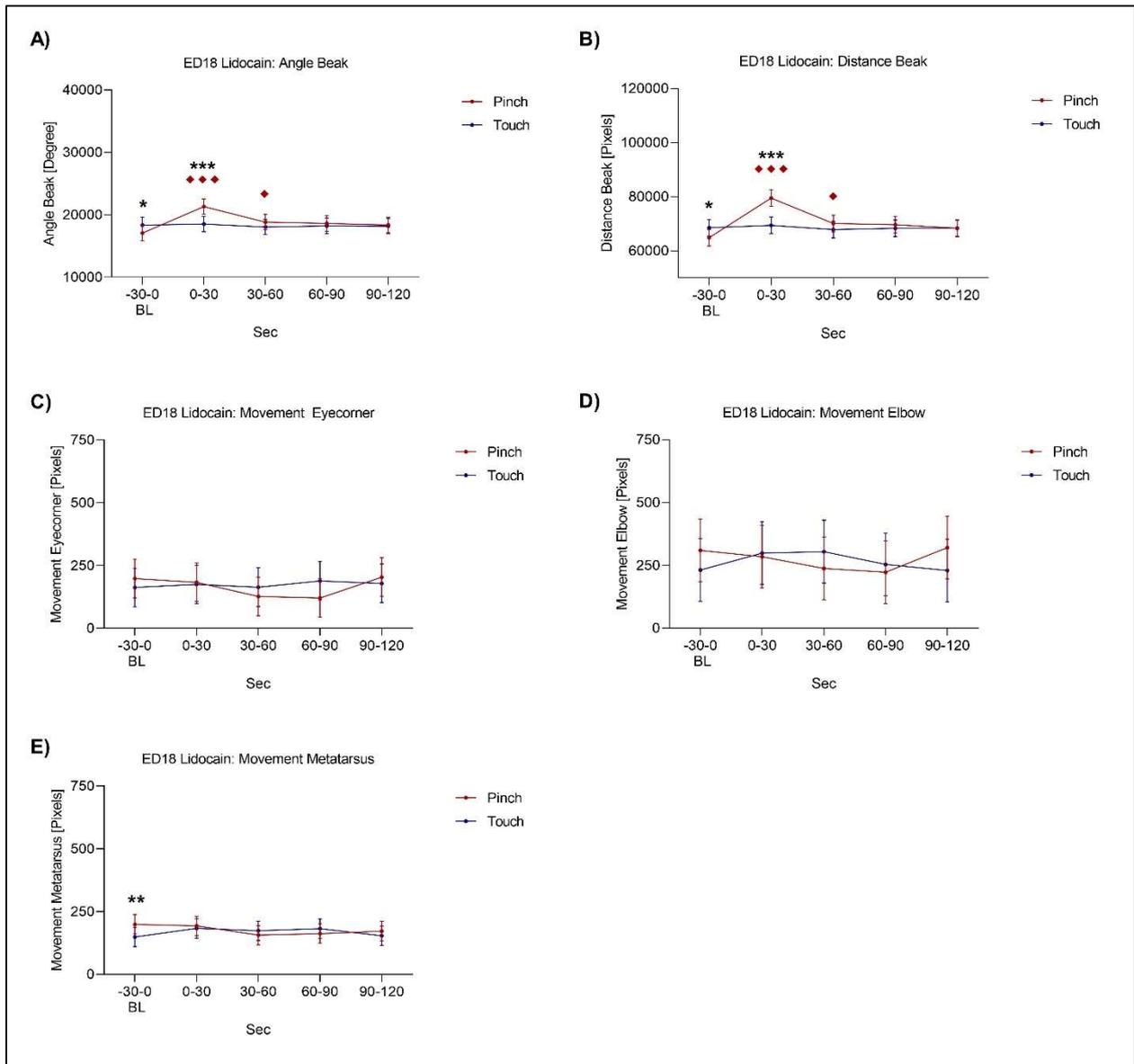


Abbildung 32 Änderungen im Winkel (A) und der Entfernung (B) zwischen Ober- und Unterschnabel als Parameter zur Erfassung der Schnabelbewegung sowie der Bewegung von medialem Augenwinkel (C), dem Ellbogen (D) und dem Metatarsus (E) von Embryonen an ED18, die eine Injektion mit Lidocain in die Schnabelbasis erhielten, über die Zeit. Darstellung des Mittelwerts (\bar{x}) \pm 95 %-Konfidenzintervall der Gruppen zu den Zeitpunkten -30-0 (Baseline, BL), 0-30, 30-60, 60-90 und 90-120 Sekunden vor bzw. nach Stimulation. Signifikanter Unterschied zwischen Pinch und Touch: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Signifikanter Unterschied zur Baseline (Touch=blau, Pinch=rot): ♦ $p \leq 0,05$, ♦♦ $p < 0,01$, ♦♦♦ $p < 0,001$.

Untersuchung der Verhaltensreaktion auf noxischen Stimulus an ED9, ED12, ED13, ED14, ED15, ED16, ED17 und ED18 mittels manuellem Score

Beak Movement und Mandibulation:

Beak Movement wurde von allen Bruttagen und zu allen Zeitpunkten vereinzelt beobachtet. Für die Bruttage ED9 und ED12 bis ED18 konnte *Mandibulation* zu beinahe allen Zeitpunkten beobachtet werden (siehe Abbildung 33).

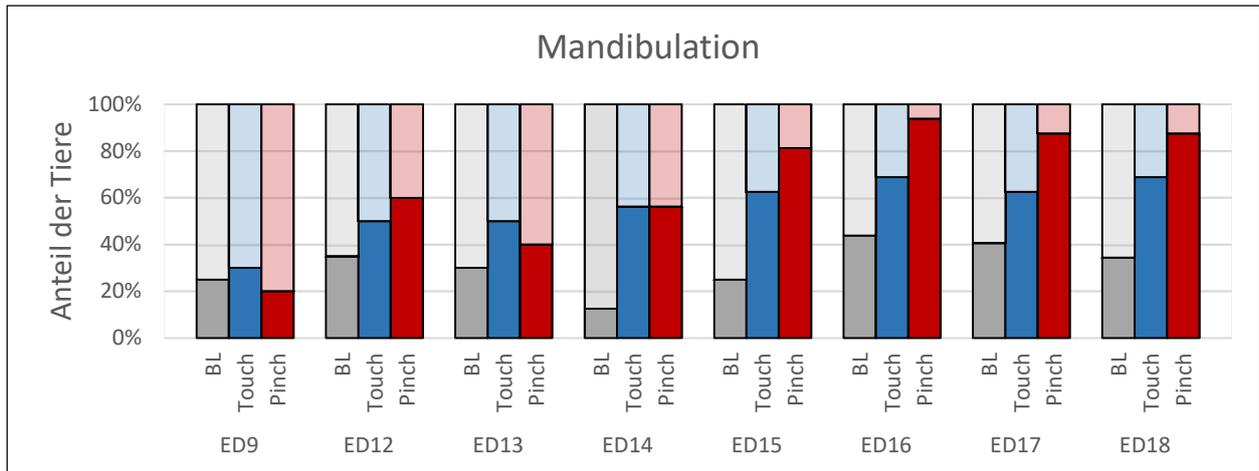


Abbildung 33 Prozentualer Anteil der Embryonen an Bruttag ED9 und ED12 bis ED18, die *Mandibulation* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten.

Beak Opening

Das Verhalten *Beak Opening* konnte an den Bruttagen ED9 und ED12 bis ED14 nur selten beobachtet werden. Bis ED12 zeigten maximal 10 %, bis ED14 maximal 20 % der Tiere einer Altersgruppe innerhalb eines Zeitintervalls dieses Verhalten. Beginnend ab ED15 konnte *Beak Opening* zunehmend häufiger (31 %) nach Applikation des mechanischen Reizes beobachtet werden. An ED16 zeigten 88 % der Embryonen *Beak Opening* in den ersten 30 Sekunden nach *Pinch*. Auch 50 % der Hühnerembryonen an ED17 und 62,5 % der Tiere an ED18 zeigten diese Verhaltensreaktion auf den *Pinch*. Nach *Touch* und in den jeweiligen Baselines vor Reiz zeigte ein deutlich geringerer Prozentsatz an Tieren das *Beak Opening* (siehe Abbildung 34).

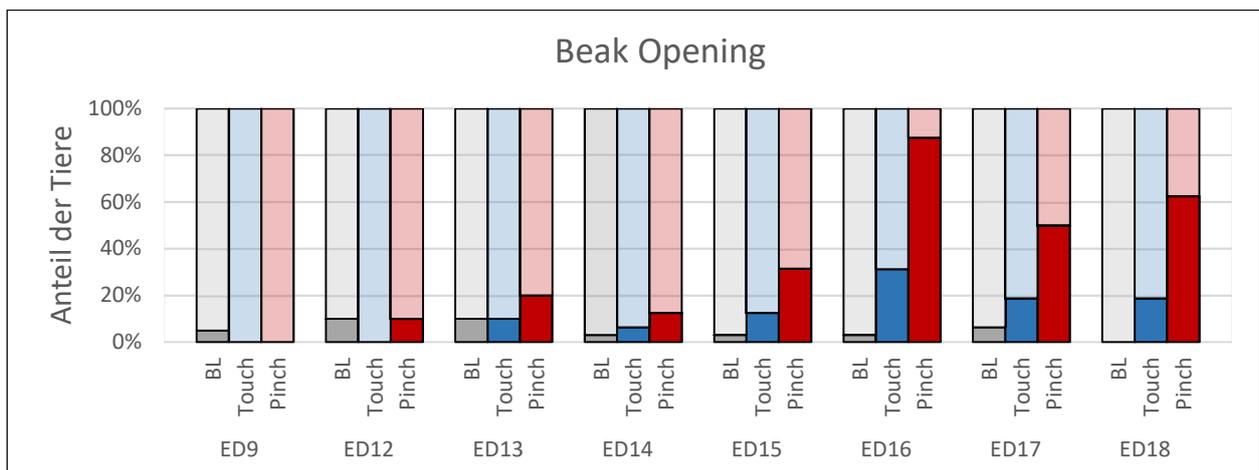


Abbildung 34 Prozentualer Anteil der Embryonen an Bruttag ED9 und ED12 bis ED18, die *Beak Opening* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten.

Wide Beak Opening

Aufgrund der noch geringen Schnabelgröße konnte dieser Parameter bei Embryonen an ED9 nicht erhoben werden. Insgesamt konnte das *Wide Beak Opening* bei Embryonen bis ED14 nur vereinzelt beobachtet werden. An ED15 zeigten 19 %, an ED16 25 % der Embryonen das *Wide*

Beak Opening in den ersten 30 Sekunden nach *Pinch*, einzelne Embryonen jedoch auch nach *Touch*. An ED17 zeigten 81 % und an ED18 88 % der Embryonen das *Wide Beak Opening* in den ersten 30 Sekunden nach *Pinch*. Dieses Verhalten konnte an diesen Bruttagen nicht in den Baselines vor *Pinch* und *Touch* und auch zu keinem Zeitpunkt nach *Touch* beobachtet werden (siehe Abbildung 35).

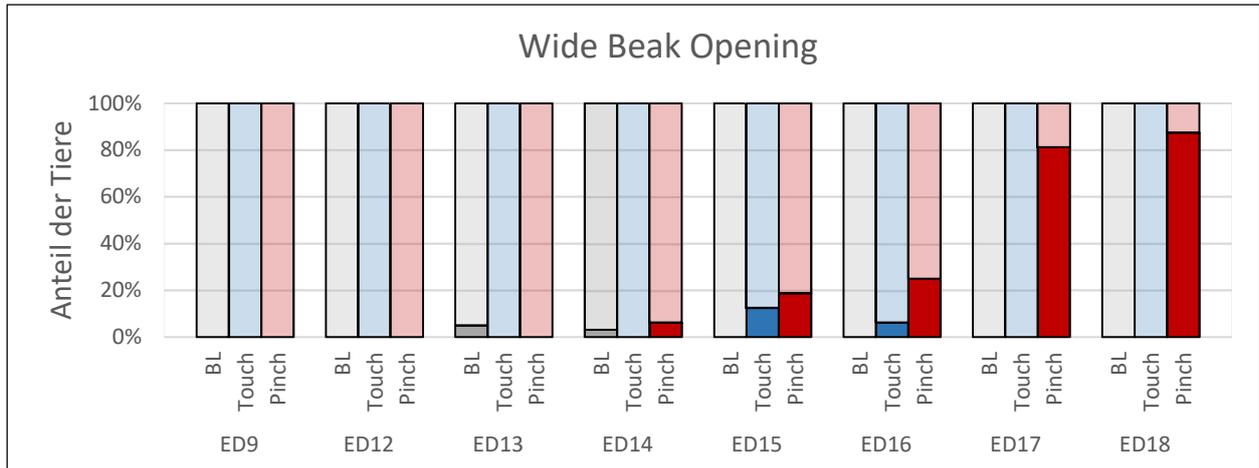


Abbildung 35 Prozentualer Anteil der Embryonen an Bruttag ED9 und ED12 bis ED18, die *Wide Beak Opening* vor (*BL*, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten.

ED18 Lidocain

Bei den mit dem Lokalanästhetikum behandelten ED18-Embryonen (*ED18 w/ Lido*) reagierten nach *Pinch* 40 % der Tiere *ED18 w/ Lido* mit *Wide Beak Opening*. Im Vergleich dazu reagierten bei unbehandelten Embryonen an ED18 (*ED18 w/o Lido*) 88 %. *Beak Opening* konnte nur bei 20 % der Tiere *ED18 w/ Lido* (vgl. 75 % bei *ED18 w/o Lido*) beobachtet werden (siehe Abbildung 36).

Auch wenn die Reaktion auf einen mechanischen Reiz an der Schnabelbasis durch das Lokalanästhetikum nicht vollständig ausgeschaltet wurde, konnte die Reaktion ca. um die Hälfte reduziert werden. Es ist dabei allerdings nicht auszuschließen, dass die Applikation des Lokalanästhetikums zu einer veränderten sensitiven Wahrnehmung im Bereich der Schnabelbasis führte und damit ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere gehabt haben könnte.

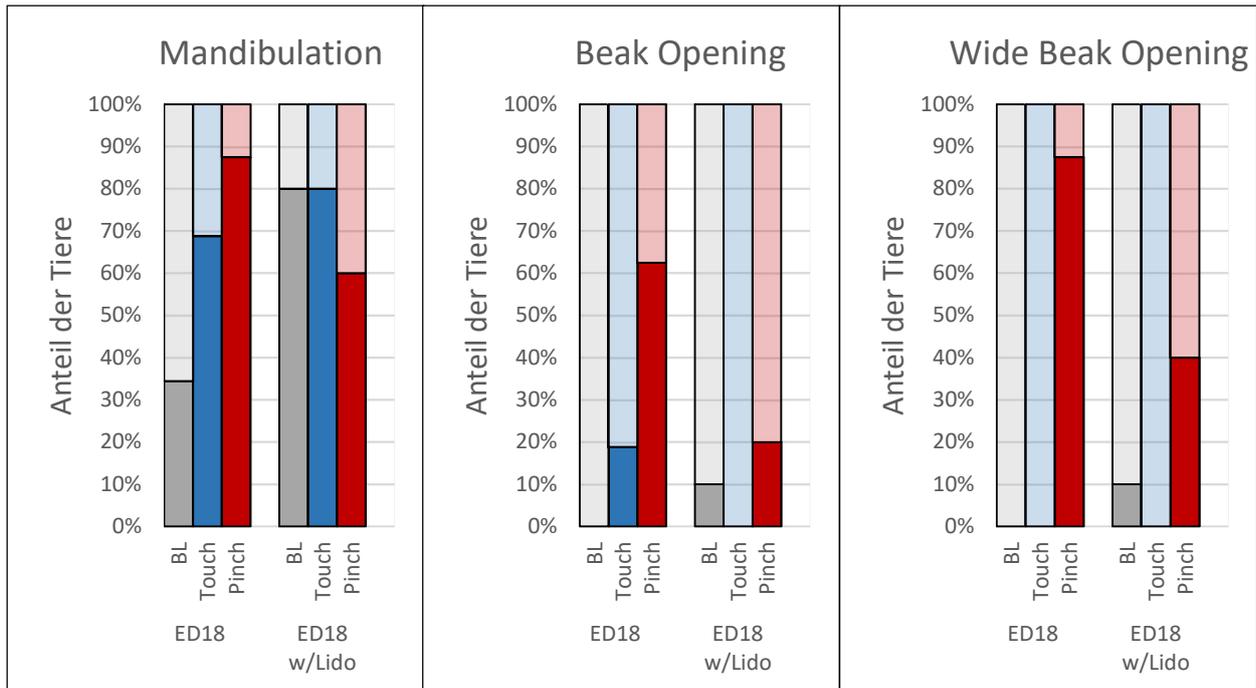


Abbildung 36 Prozentualer Anteil der Embryonen an Bruttag ED18, die Schnabelbewegungen (*Mandibulation, Beak Opening, Wide Beak Opening*) vor (*BL, Baseline*: Grau) und *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Je nach Versuchsgruppe erhielten die Embryonen zuvor eine (*ED18 w*) oder keine (*ED18 w/o*) Lidocain-Injektion in die Schnabelbasis.

3.1.2.3. Elektrophysiologische Parameter

Die Bestimmung des Geschlechts der Versuchstiere erfolgte zwischen ED12 und ED19 durch makroskopische Untersuchung der Keimdrüsen bei insgesamt 280 Embryonen (♂ n=144, ♀ n=136).

Das basale, nicht prozessierte Roh-EEG der drei ausgewählten Embryonen in Abbildung 37 überstieg von ED7 bis ED12 nur selten 50 μ V mit einer zufälligen Verteilung um die Nulllinie. Ein Anstieg der Amplitude wurde von ED12 auf ED13 bis ED19 beobachtet, wobei die Amplitude hierbei regelmäßig 100 μ V überstieg. Dies wird durch die DSA-Daten in Abbildung 38 bestätigt: ED7 bis ED12 zeigten in beiden Frequenzbändern kein dominantes Signal, abgesehen von einigen geringfügigen, aber konsistenten Oszillationen in den niedrigen Deltaregionen um 1-2 Hz und einem isolierten Signal bei 16 2/3 Hz.

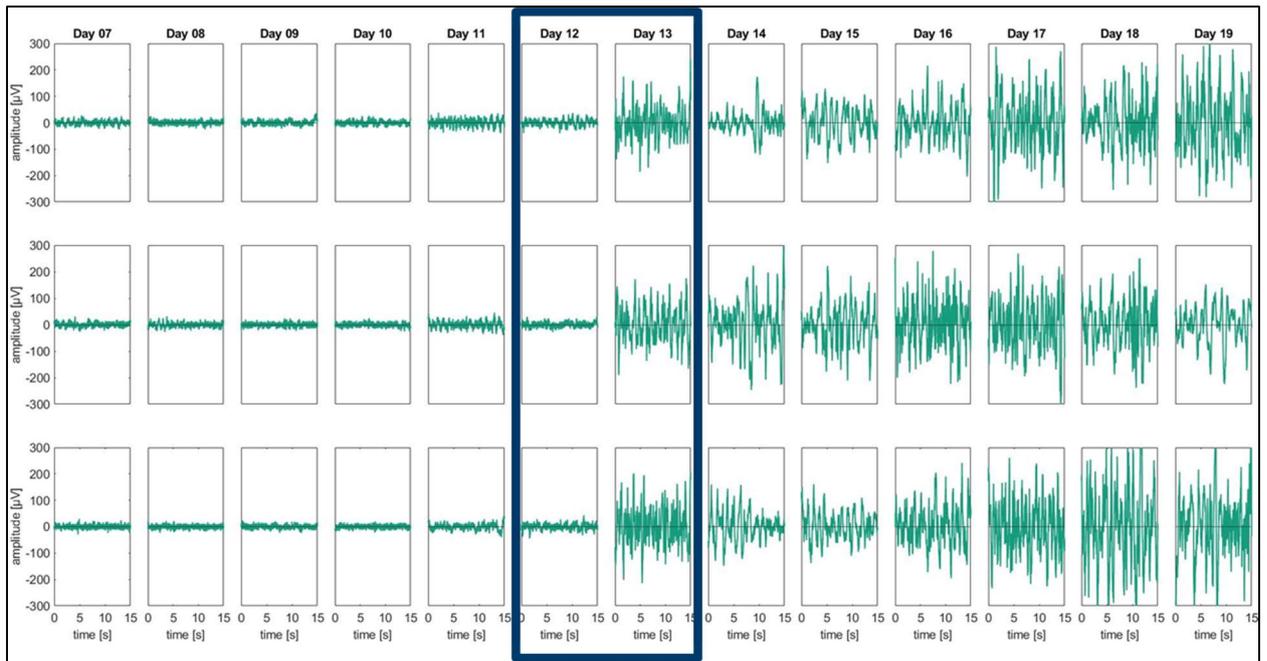


Abbildung 37 Überblick über basale, nicht prozessierte Roh-EEGs (Dauer: 15 Sekunde je Aufnahme) von drei zufällig ausgewählten Datensätzen der Entwicklungsstufen ED7 bis ED19. Ein Beginn der physiologischen EEG-Signaturen ist ab ED13 deutlich sichtbar.

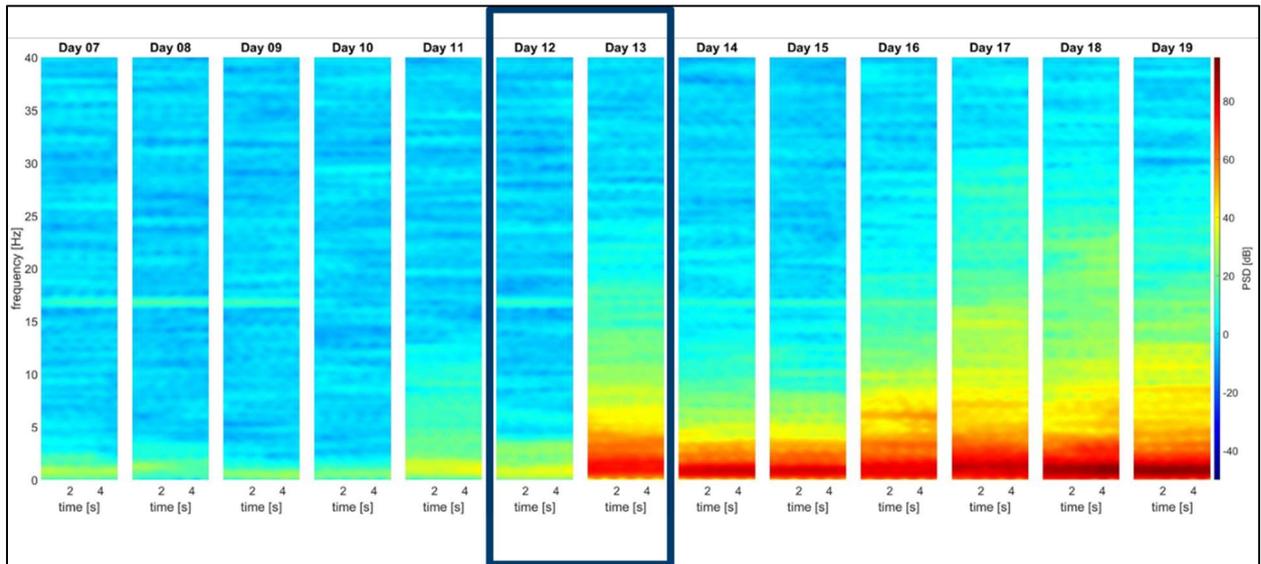


Abbildung 38 Spektrale DSA-Darstellung von sechs zufällig ausgewählten EEG-Datensätzen pro Entwicklungsstufe von ED7 bis ED19. Die spektrale Leistungsdichte wurde für jeden einzelnen Datensatz berechnet und anschließend über alle sechs Datensätze pro Entwicklungsstadium gemittelt. Auch hier ist ab ED13 der Beginn von prominenten, langsamen Delta-Oszillationen zu erkennen.

In Tabelle 6 sind der Median und die [25%, 75%]-Quartile des Delta-Bandes (1-4 Hz) für jedes Entwicklungsstadium der spektralen DSA-Darstellung (Abbildung 38) angegeben. Zwischen ED12 und ED13 stieg die durchschnittliche Leistung im Deltaband um mehr als 40 dB (absolut). Nach der zeitlichen Mittelung der EEG-Daten im Delta-Bereich von 1-4 Hz ergab dieser Vergleich, dass diese Leistungszunahme statistisch signifikant ist ($p = 1,42 \cdot 10^{-9}$). Es wurde ein weiterer Anstieg zwischen ED10 und ED11 von etwa 13 dB beobachtet, der ebenfalls statistisch signifikant war ($p = 7,34 \cdot 10^{-9}$).

Tabelle 6 Median und [25 %, 75 %]-Quartile von 6 zufällig ausgewählten Embryonen in jedem Entwicklungsstadium des PSD-Delta-Bandes (1 - 4 Hz), wie in der spektralen DSA-Darstellung (Abbildung 38) gezeigt.

Brutttag	ED7	ED8	ED9	ED10	ED11	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18	ED19
Median PSD [db]	9.77	4.69	1.93	1.45	15.71	22.40	66.74	59.37	63.48	59.03	65.69	68.09	62.37
[25% 75%] Quartile across time [db]	[4.72 13.57]	[3.14 10.74]	[0.31 4.55]	[0.45 5.06]	[14.29 25.29]	[20.21 25.52]	[63.64 73.95]	[52.08 66.85]	[57.75 72.65]	[56.53 71.04]	[59.16 75.07]	[62.48 76.15]	[58.31 72.67]
[25% 75%] Quartile across frequency [db]	[8.03 10.50]	[4.58 5.24]	[1.65 2.57]	[1.25 2.17]	[15.03 16.24]	[22.05 22.94]	[66.35 67.24]	[58.87 60.19]	[62.80 63.99]	[58.50 59.42]	[65.27 65.90]	[65.62 68.91]	[61.31 63.02]

Abbildung 39 zeigt sowohl mediane ereigniskorrelierte spektrale Ereignisse (ERSP), als auch die Kohärenz zwischen den Trials (ITC), sowohl für die thermische als auch für die elektrische Stimulation. Nach Anwendung der in Abschnitt 2.3.4 definierten Schwellenwerte von [-2 dB, 2 dB] konnte ein lokales Maximum von 2,79 dB [-2,15 dB, 5,16 dB] bei 6,41 Hz und 1052 ms nach thermischer Stimulation definiert werden (Abbildung 39 Bild 1). Das mediane lokale ITC-Maximum für die thermische Stimulation (Abbildung 39 Bild 2) mit einem Wert von 0,38 [0,27, 0,42] trat bei 6,41 Hz und 797 ms auf. Hier war das lokale ITC-Maximum nach thermischer Stimulation sehr schwach sichtbar, was darauf hindeutet, dass die Phase der Oszillation nach dem Stimulus bei der gegebenen Zeit und Frequenz nicht völlig zufällig, aber dennoch nicht über alle Versuche hinweg identisch ist.

Nach der elektrischen Stimulation fand sich ein lokales Maximum von 2,23 dB [0,68 dB, 2,23 dB] bei 13,24 Hz und 543 ms (Abbildung 39 Bild 3). Es wurde keine weitere ERSP-Reaktion beobachtet, die die von der Arbeitsgruppe gewählten Schwellenwerte überschritt. Beide hier definierten Reaktionen traten außerhalb der Bereiche auf, in denen sie, wie im Abschnitt 2.3.4 einführend beschrieben, erwartet wurden. Das mediane lokale ITC-Maximum für die elektrische Stimulation (Abbildung 39 Bild 4) mit einem Wert von 0,23 [0,11, 0,29] trat bei 28,35 Hz und

0,33 Hz auf. Beide lokalen ITC-Maxima entsprachen nicht einer ERSP-Reaktion, d. h. einer Deaktivierung oder Aktivierung, die -2 dB bzw. 2 dB übersteigt. Insgesamt ergab die ITC-Analyse einen geringen Grad an Phasenüberschneidung im untersuchten Zeit- und Frequenzbereich. Eine Stimulus-adäquate EEG-Aktivierung konnte zu keinem Zeitpunkt der Messungen identifiziert werden.

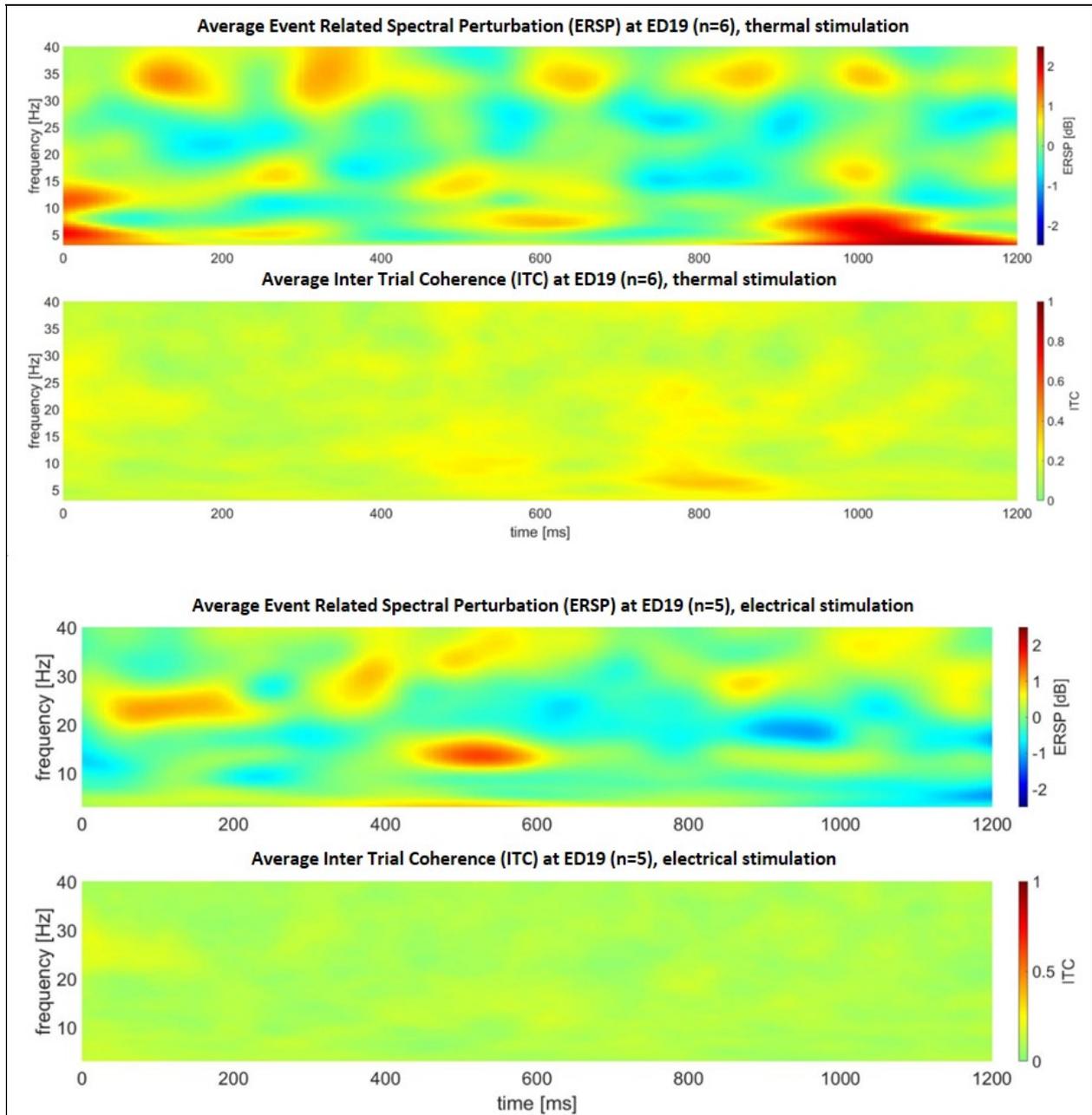


Abbildung 39 Bild 1 und 2: Mediane oszillatorische Antworten (Bild 1) als ereigniskorrelierte spektrale Ereignisse (ERSP) und Intertrial-Kohärenz (ITC, Bild 2) nach thermischer Stimulation. Bild 3 und 4: Mediane oszillatorische Antworten (Bild 3) als ereigniskorrelierte spektrale Ereignisse (ERSP) und Intertrial-Kohärenz (ITC, Bild 4) nach elektrischer Stimulation. Aufnahmezeitpunkt aller gemittelten Daten: ED19.

Die anatomischen Schnittpräparate (Abbildung 40, Abbildung 41) zeigen deutlich sichtbare Unterschiede in der Ausdifferenzierung einzelner neuronaler Gebiete. Für ED7 war es ohne Perfusion nicht möglich, das embryonale Gehirn vollständig zu entnehmen. Alternativ wurden

Schnittpräparate des ganzen Kopfes hergestellt. Augen, embryonal angelegte knöchernen und knorpelige Strukturen bilden die dominanten Bereiche des Präparats (Abbildung 40). Neuronale Strukturen sind kaum zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind am Entwicklungstag ED12 (Abbildung 41) wesentliche Strukturen des Vogelgehirns anatomisch abgebildet. Das Einsetzen einer physiologischen EEG-Aktivität scheint durch die anatomische Ausprägung des ED12-Gehirns unterstützt zu werden. Finale Aussagen einer morphologisch-physiologischen Korrelation lassen sich daraus jedoch nicht ableiten.

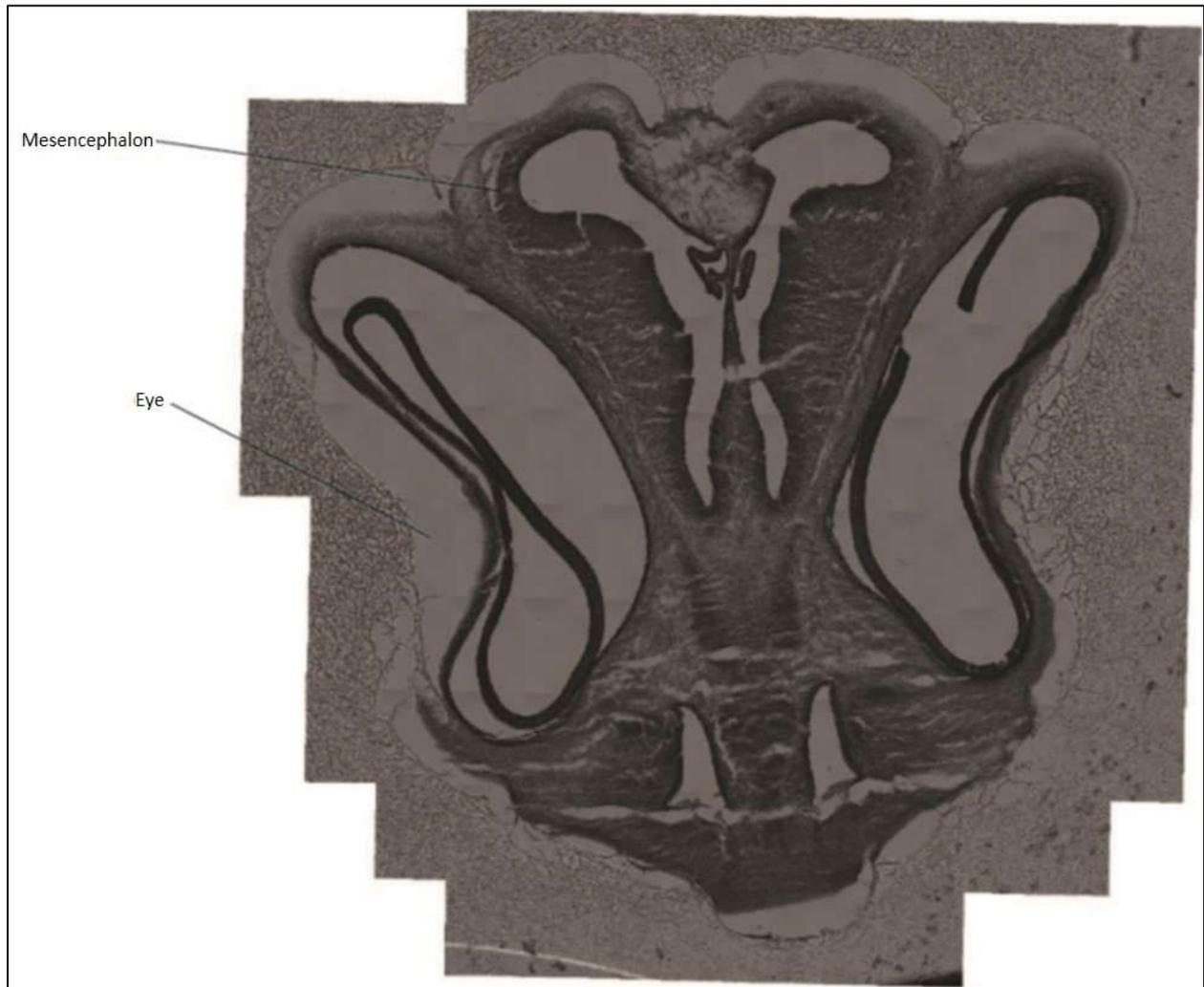


Abbildung 40 Medio-frontales Schnittpräparat eines embryonalen ED7-Gehirns. Der Schnitt zeigt neben den anatomischen Strukturen des wachsenden Kopfes zu beiden Seiten die Augen (Eye), welche als Präparationsartefakt (Wasserentzug während der Färbung) von außen eingedrückt dargestellt sind. Weiter sind die dominanten dorso-medialen Ventrikel und das entstehende Mesencephalon zu erkennen. Die Benennung der anatomischen Strukturen (Mesencephalon) erfolgte ohne weitere histologische und physiologische Verifizierung und stellt somit lediglich eine generelle Übersicht dar.

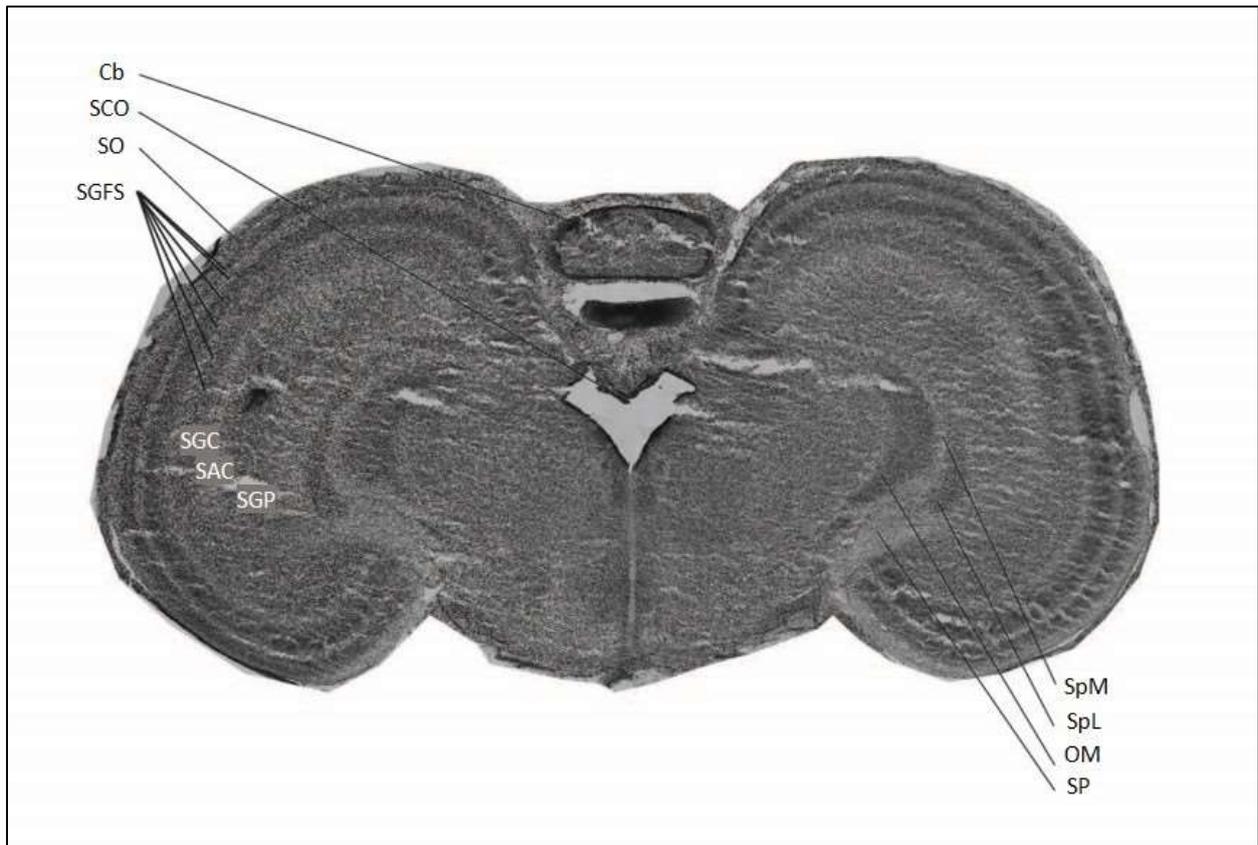


Abbildung 41 Medio-frontales Schnittpräparat eines embryonalen ED12-Gehirns. Der Schnitt zeigt eine sehr weit fortgeschrittene Entwicklung des embryonalen Gehirns mit zentral ausgeprägten anatomischen Strukturen. Abkürzungen: Cb: Cerebellum; SCO: Organum subcommissurale; SO: Stratum opticum; SGFS: Stratum griseum et fibrosum superficiale; SpM: Nucleus piriformis medialis; SpL: Nucleus piriformis lateralis; OM: Tractus occipitomesencephalicus; SP: Nucleus subpretectalis; SGC: Stratum griseum centrale; SAC: Stratum album centrale; SGP: Stratum griseum periventriculare. Die Benennung der anatomischen Strukturen (siehe Abkürzungen) erfolgte ohne weitere histologische und physiologische Verifizierung und stellt somit lediglich eine generelle Übersicht dar.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen der Studie „Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen“ wurden mittels kardiovaskulärer und elektrophysiologischer Parameter sowie Verhaltensparametern neue Erkenntnisse zur Beurteilung von Nozizeption und Schmerzempfinden beim Hühnerembryo gewonnen. Zudem konnten neue Methoden zur Messung von physiologischen Parametern im Hühnerembryo etabliert werden. Damit wurde die bestehende wissenschaftliche Datenlage umfangreich ergänzt.

Vorherige Studien legten nahe, dass vor Bruttag 7 keine Nozizeption beim Hühnerembryo vorhanden ist, weshalb angenommen werden konnte, dass Hühnerembryonen die Fähigkeit zu Nozizeption bzw. Schmerzempfinden erst nach dem 7. Bruttag im Laufe der Embryonalentwicklung erlangen. Allerdings reichte der bisherige Wissenstand nicht aus, um den Zeitraum näher einzugrenzen. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann der Zeitraum von Bruttag 7 bis Bruttag 18 bzw. 19 in Bezug auf Nozizeption und Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen näher beurteilt werden.

Als Goldstandard zur Beurteilung von Schmerzempfinden gilt in der Humanmedizin die Selbstauskunft. Naturgemäß ist dies bei Tieren und somit auch bei Hühnerembryonen nicht möglich. Nozizeption hingegen kann auch beim Tier anhand der Messung nozizeptiver Reaktionen gemessen werden. Die Erhebung von kardiovaskulären Parametern und Verhaltensveränderungen sind bekanntermaßen zur klinischen Beurteilung von Nozizeption beim Säuger geeignet und konnten in dieser Studie für den Hühnerembryo bestätigt werden. Besonders der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) stellte sich als sensitiver kardiovaskulärer Parameter in der Beurteilung einer nozizeptiven Antwort auf eine mechanische Noxe an der Schnabelbasis bei ED16- bis ED18-Embryonen dar. Veränderungen im Verhalten auf den mechanischen Stimulus am Schnabel traten besonders bei Embryonen an ED15 bis ED18 in Form von einer Zunahme der Schnabelöffnungen auf. Die embryonale Entwicklung eines physiologischen EEG-Musters im Hühnerembryo konnte im Rahmen der Studie erfolgreich dokumentiert werden. Ein physiologisch adäquates EEG-Muster als Voraussetzung zur zentralen Prozessierung peripherer Stimuli kann wahrscheinlich ab ED13 angenommen werden. Histologische Befunde stützen diese Annahme. Die Abbildung eines Stimulus-adäquaten EEG-Musters konnte in der Studie nicht umgesetzt werden. Hierzu müssten noch umfangreichere anatomische und elektrophysiologische Studien durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kardiovaskuläre Reaktionen auf einen mechanischen Reiz signifikant ab ED16 auftraten, bei Einzeltieren ab ED15. Ebenfalls wurde eine signifikante Verhaltensreaktion auf einen mechanischen Reiz bei ED15- bis ED18-Embryonen beobachtet.

Die Fähigkeit zur Reizweiterleitung (Nozizeption) kann auf Basis der Ergebnisse an ED15 nicht ausgeschlossen und ab ED16 angenommen werden. Bezüglich der EEG-Analyse war eine physiologische neuronale Aktivität des Gehirns ab ED13 messbar. Dies lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass die Fähigkeit zur Reizweiterleitung (Nozizeption), bzw. die Fähigkeit, aversive Sinneserlebnisse als Schmerzen zu empfinden, ab diesem Zeitpunkt potentiell vorhanden ist. Andererseits zeigt es, dass bis inklusive ED12 die Verarbeitung eines noxischen Stimulus im Gehirn nicht möglich scheint.

Die Änderung des Tierschutzgesetzes „Verbot des Kükentötens“ vom 18. Juni 2021 sieht basierend auf der bisherigen wissenschaftlichen Datenlage ein Verbot des Tötens von Hühnerembryonen im Rahmen der Geschlechtsbestimmung nach dem 6. Bruttag vor. Die aktualisierte Datenlage bietet nun eine Grundlage zur Diskussion einer möglichen Anpassung des Gesetzes. Zudem sind die gewonnenen Erkenntnisse wichtig, wenn Eingriffe und Behandlungen an embryonierten Hühnereiern z. B. zu Versuchszwecken durchgeführt werden. Basierend auf den vorliegenden Studienergebnissen und im Sinne des Tierschutzes besteht hier entsprechender Forschungsbedarf um geeignete Anästhesie- und Analgesieverfahren für Hühnerembryonen bei potentiell schmerzhaften Eingriffen zu entwickeln und zu implementieren.

5. Zusammenfassung

In Deutschland ist das Töten männlicher Eintagsküken seit 2022 gesetzlich verboten (TierSchG, 2022). Ab 2024 ist es zudem untersagt, dass männliche Hühnerembryonen nach Geschlechtsbestimmung im Ei nach dem 6. Bruttag getötet werden. Dieser Entwicklungszeitpunkt wurde festgelegt, da bisherige Studien darauf hindeuten, dass die beginnende Entwicklung des Schmerzempfindens bei Hühnerembryonen ab dem 7. Tag der Inkubation (Embryonic Day, ED), und somit auch die Fähigkeit zur sog. Nozizeption (Reizweiterleitung) im Ei, nicht ausgeschlossen werden kann. Mit Blick auf diese wissenschaftliche Grundlage des Gesetzes hat das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft eine Studie in Auftrag gegeben, mit dem Ziel, den Zeitraum näher zu bestimmen, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln, bzw. die Fähigkeit entwickeln, aversive Sinneserlebnisse als Schmerzen zu empfinden.

In der vorliegenden Studie wurden von Bruttag ED7 bis ED19 Lohman Selected Leghorn Hühnerembryonen verwendet. Die Entwicklungstage (Embryonic Days, EDs) wurden so definiert, dass der Tag des Einlegens als ED0 gezählt wurde. Alle Messungen wurden *in ovo* (im Ei) durchgeführt. In randomisierter Reihenfolge wurden ein noxischer (tatsächlich oder potentiell gewebschädigender) Reiz (*Pinch*) und ein Kontrollreiz (*Touch*) gesetzt. Als noxischer Reiz wurde für die kardiovaskulären Parameter und die Verhaltensbeobachtungen an der Schnabelbasis ein mechanischer Reiz gesetzt. Die Reaktion wurde mit dem Reiz durch Berührung des Schnabels (*Touch*) verglichen. Als eine zweite Kontrollgruppe wurde an ED18 vor dem mechanischen Reiz das Lokalanästhetikum Lidocain in die Schnabelbasis appliziert. Für die elektrophysiologischen Parameter wurden noxische Reize (Wärmereiz, elektrischer Reiz) mit einem Peltier-Element und mit Stimulationselektroden verwendet.

Die Reaktionen der Hühnerembryonen wurden anhand der folgenden Parameter untersucht:

- **Kardiovaskuläre Parameter:** Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HR) wurden mit einem Mikrokatheter, der in eine Arterie der Chorioallantoismembran eingesetzt wurde, aufgezeichnet.
- **Verhalten:** Bewegungen wurden aufgenommen und mit einer Deep-Learning-Software (DeepLabCut, DLC) und einem manuellen Score ausgewertet.
- **Elektroenzephalogramm (EEG):** Die elektrische Gehirnaktivität wurde mit Messelektroden im Bereich des Hyperpalliums und des Cerebellums gemessen.

Nach dem mechanischen Reiz stieg der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) von Hühnerembryonen an Embryonic Day (ED) 16 bis 18 signifikant an. Ebenfalls wurde ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz (HR) nach dem mechanischen Reiz bei ED17 und ED18 beobachtet. Die Injektion des Lokalanästhetikums Lidocain reduzierte die Reaktion von MAP auf

den mechanischen Reiz bei ED18-Embryonen signifikant. Einzelne Embryonen zeigten an ED15 Reaktionen im MAP und der HR. Dabei wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen mechanischem Reiz und Berührung festgestellt. Bei Embryonen jünger als ED15 wurde kein Anstieg von MAP oder HR beobachtet. Die Schnabelbewegungen nahmen nach dem mechanischen Reiz bei ED15- bis ED18-Embryonen im Vergleich zu der Berührung signifikant zu. In den ersten 30 Sekunden nach dem mechanischen Reiz nahmen auch die Bewegungen von Kopf, Ellbogen und Metatarsus bei ED18 signifikant zu. Von ED7 bis ED12 konnte kein physiologisches EEG der Hühnerembryonen im Ei nachgewiesen werden. Ab ED13 konnte eine physiologische Hirnaktivität zuverlässig aufgezeichnet werden. Eine adäquate EEG-Reaktion auf den Wärmereiz oder elektrischen Reiz konnte ab ED13 nicht verzeichnet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kardiovaskuläre Reaktionen auf einen mechanischen Reiz signifikant ab ED16 auftraten, bei Einzeltieren ab ED15. Ebenfalls wurde eine signifikante Verhaltensreaktion auf einen mechanischen Reiz bei ED15- bis ED18-Embryonen beobachtet. Die Fähigkeit zur Reizweiterleitung (Nozizeption) kann auf Basis der Ergebnisse an ED15 nicht ausgeschlossen und ab ED16 angenommen werden. Eine physiologische neuronale Aktivität des Gehirns ist ab ED13 messbar. Dies lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass die Fähigkeit zur Reizweiterleitung (Nozizeption), bzw. die Fähigkeit, aversive Sinneserlebnisse als Schmerzen zu empfinden, ab diesem Zeitpunkt potentiell vorhanden ist. Andererseits zeigt es, dass bis inklusive ED12 die Verarbeitung eines noxischen Stimulus im Gehirn nicht möglich scheint.

Gesamtübersicht

Eine Übersicht über erste messbare Reaktionen auf den *Pinch* in den jeweiligen Parametern (MAP, HF, Verhalten) sowie das Einsetzen eines messbaren EEGs entlang der einzelnen Bruttage ist in Abbildung 42 dargestellt.

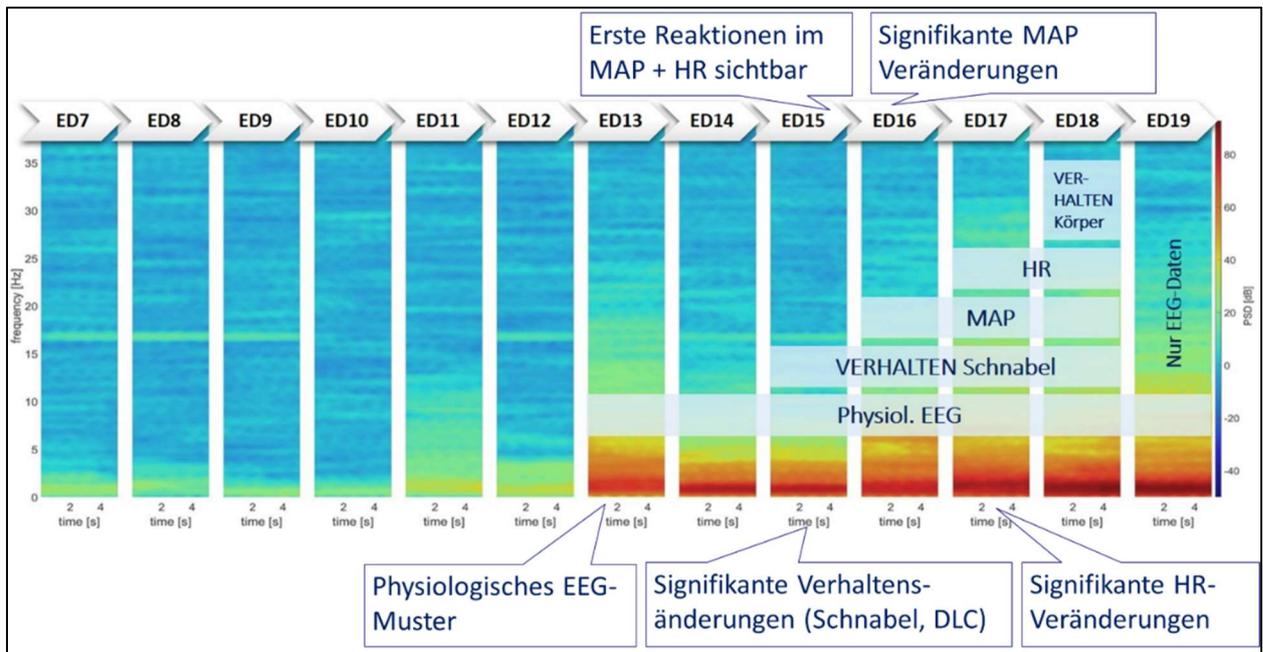


Abbildung 42 Übersicht über signifikante Reaktionen auf eine mechanische Stimulation in den jeweiligen Parametern (mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HR), Verhalten). Darstellung anhand der Spektralanalyse eines repräsentativen Elektroenzephalogramms (EEG) der einzelnen Bruttage, das den Beginn eines physiologischen EEGs ab ED13 zeigt.

6. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Änderungen während der Projektphase

Es haben sich während der Projektphase folgende inhaltliche Änderungen bzw. Anpassungen ergeben:

Vorstudie 1

- Es wurden zwei Ei-Systeme zur Bebrütung der Embryonen evaluiert: Zum einen wurden die Bruteier an ED3 fenestriert, abgedeckt und bis zum Untersuchungstag weiterbebrütet. Zum anderen wurden sog. Surrogates, Doppeldottereierschalen, in die der drei Tage alte Hühnerembryo zur weiteren Bebrütung überführt wurde, evaluiert. Die Wahl des Ei-Systems für die weiteren Studien fiel auf das fenestrierte Ei-System.
- Nach Durchführung von Vorstudie 1 stellte sich heraus, dass die erhobenen neurohumoralen Parameter nicht geeignet waren, um nozizeptive Reaktionen der Hühnerembryonen abzubilden. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Studienteilen auf die Erhebung der neurohumoralen Parameter verzichtet.

Hauptstudie

- Im Laufe der Studie wurden auch ältere Bruttage in die Untersuchungen eingeschlossen, um Parameterveränderungen sicher als nozizeptive Reaktionen auf einen Stimulus interpretieren zu können. Aus diesem Grund wurde der vorher definierte Untersuchungszeitraum von ED7 bis ED14 auf ältere Bruttage (bis ED18 bzw. ED19) ausgeweitet. Es wurden alle Bruttage >ED14, bei denen die Etablierung der Messungen in das Versuchssetup möglich war, in die Hauptstudie aufgenommen. Ziel war es, sich vom ältesten Bruttag, bei dem die Fähigkeit zur Nozizeption anzunehmen war, bis zum jüngsten Bruttag zurückzuarbeiten, um den Entwicklungszeitpunkt zu bestimmen, bis zu dem noch Veränderungen auf einen noxischen Reiz zu beobachten sind.
- An ED18 wurde eine zusätzliche Versuchsgruppe mitgeführt, um zu untersuchen, ob die Applikation eines Lokalanästhetikums die Reaktion auf den *Pinch* reduzieren kann. Es wurden n=6 Embryonen in den kardiovaskulären Parametern und n=5 Embryonen in den Verhaltensbeobachtungen untersucht.
- Da die Messdaten valide Ergebnisse zeigten, die erhobenen Daten größtenteils normalverteilt waren und eine geringe Standardabweichung aufwiesen, wurde aus Tierschutzgründen und unter Abwägung zeitlicher Aspekte entschieden, die im

Originalantrag geschätzten Gruppengrößen auf die in den jeweiligen Versuchsabschnitten erwähnten Tierzahlen anzupassen.

- Zur Tierzahlreduktion wurde bei den jeweiligen Parametern auf Messungen an den folgenden Bruttage ver zichtet:
 - Kardiovaskuläre Parameter: ED8, ED10, ED11
 - Verhalten: ED7, ED8, ED10, ED11

7. Literaturverzeichnis

- ACUC University of California (2020). Animal Care and Use Committee: Euthanasia Guidelines.
- Aleksandrowicz, E., & Herr, I. (2015). Ethical Euthanasia and Short-Term Anesthesia of the Chick Embryo. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 32(2), 143-147.
- Anders, M., Anders, B., Dreismickenbecker, E., Hight, D., Kreuzer, M., Walter, C. & Zinn, S. (2023). EEG responses to standardised noxious stimulation during clinical anaesthesia: a pilot study. *BJA Open*, 5, 100118.
- Anders, M., Dreismickenbecker, E., Fleckenstein, J., Walter, C., Enax-Krumova, E.K., Fischer, M.J., Kreuzer, M. & Zinn, S. (2022). EEG-based sensory testing reveals altered nociceptive processing in elite endurance athletes. *Experimental Brain Research*, 241(2), 341–354.
- AVMA (2020). Guidelines for the Euthanasia of Animals.
- Bogdanov, O.V., Smetankin, A.A., Saraev, S.Y., Mikhailenok, E.L. & Ved, V.V. (1984). Electrical activity of the chick embryo brain during development of stable rearrangements of movement. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 14, 79-87.
- Bjørnstad, S., Austdal, L. P. E., Roald, B., Glover, J. C., & Paulsen, R. E. (2015). Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(3), 386-396.
- Chang, C.Y., Hsu, S.H., Pion-Tonachini, L. & Jung, T.P. (2018). Evaluation of Artifact Subspace Reconstruction for Automatic EEG Artifact Removal. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2018, 1242-1245.
- Chumak (1961). Dinamika reflektomykh reaktsii i vklyuchenie retseptornykh apparatov u embriona kuritsy (Dynamics of reflex reactions and initiation of receptor systems in the chick embryo). In *Sbornik, Hrsg. Voprosy fiziologii i patologii tsentral'noi nervnoi sistemy cheloveka i zhivotnykh v ontogeneze Moskva*.
- Delorme, A. & Makeig, S. (2004). EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 134, 9-21.
- Douglas, J. M., Sanchez-Migallon Guzman, D., & Paul-Murphy, J. R. (2018). Pain in Birds: The Anatomical and Physiological Basis. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(1), 17-31.
- Eide, A. L., & Glover, J. C. (1995). Development of the longitudinal projection patterns of lumbar primary sensory afferents in the chicken embryo. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 247-259.
- Fenzl, T. & Schuller, G. (2002). Periaqueductal gray and the region of the paralemniscal area have different functions in the control of vocalization in the neotropical bat, *Phyllostomus discolor*. *European Journal of Neuroscience*, 16, 1974-1986.
- Fenzl, T. & Schuller, G. (2005). Echolocation calls and communication calls are controlled differentially in the brainstem of the bat *Phyllostomus discolor*. *BMC Biology*, 3, 17.
- Fenzl, T. & Schuller, G. (2007). Dissimilarities in the vocal control over communication and echolocation calls in bats. *Behavioural Brain Research*, 182, 173-179.

- Fenzl, T., Touma, C., Romanowski, C.P.N., Ruschel, J., Holsboer, F., Landgraf, R., Kimura, M. & Yassouridis, A. (2011). Sleep disturbances in highly stress reactive mice: Modeling endophenotypes of major depression. *BMC Neuroscience*, 12, 29.
- Freeman, B. M., & Vince, M. A. (1974). *Development of the Avian Embryo - A Behavioural and Physiological Study*. Springer, Dordrecht.
- Fritz, E.M., Kreuzer, M., Altunkaya, A., Singewald, N. & Fenzl, T. (2021). Altered sleep behavior in a genetic mouse model of impaired fear extinction. *Scientific reports*, 11, 1-16.
- Fulda, S., Romanowski, C., Becker, A., Wetter, T., Kimura, M. & Fenzl, T. (2011). Rapid eye movements during sleep in mice: High trait-like stability qualifies rapid eye movement density for characterization of phenotypic variation in sleep patterns of rodents. *BMC Neuroscience*, 12, 110.
- Garcia-Austt, E., Jr. (1954). Development of electrical activity in cerebral hemispheres of the chick embryo. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 86(2), 348-352.
- Gentle, M. J. (1992). Pain in Birds. *Animal Welfare*, 1(4), 235-247.
- Gentle M.J., T.V., McKeegan D.E.F. (2001). Mechanothermal nociceptors in the scaly skin of the chicken leg. *Neuroscience*, 106, 643-652.
- Gentle, M. J. (2011). Pain issues in poultry. *Applied Animal Behaviour Science*, 135(3), 252-258.
- Grandchamp, R. & Delorme, A. (2011). Single-trial normalization for event-related spectral decomposition reduces sensitivity to noisy trials. *Frontiers in Psychology*, 2, 236.
- Güntürkün, O., von Eugen, K., Packheiser, J., & Pusch, R. (2021). Avian pallial circuits and cognition: A comparison to mammals. *Current Opinion in Neurobiology*, 71, 29-36.
- Henke, J., Tacke, S., Erhardt, W. (2012). Analgesie: Schmerz beim Tier. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, 2. Auflage. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S. Hrsg. Stuttgart: Schattauer GmbH, 385-398.
- Herrmann, C.S., Rach, S., Vosskuhl, J. & Strüber, D. (2014). Time-frequency analysis of event-related potentials: a brief tutorial. *Brain Topography*, 27, 438-450.
- Horr, M., Sommerfeld, S., Silva, M. V., Fonseca, B. B. (2023). A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. *Experimental animals*, 10.1538/expanim.22-0133.
- Hothersall B., C.G., Nicol C.J., Taylor P.M., Waterman-Pearson A.E., Weeks C.A., Murrell J.C. (2011). Development of mechanical and thermal nociceptive threshold testing devices in unrestrained birds (broiler chickens). *Journal of Neuroscience Methods*. *Journal of neuroscience methods*, 201(1), 220–227.
- Hothersall B., C.G., Parker R.M.A., Nicol C.J., Waterman-Pearson A.E., Weeks C.A., Murrell J.C. (2014). Thermal nociceptive threshold testing detects altered sensory processing in broiler chickens with spontaneous lameness. *PloS one*, 9, e97883.
- Katori, M. (1962). The development of the spontaneous electrical activity in the brain of a chick embryo and the effects of several drugs on it. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 12, 9-25.
- Krautwald-Junghanns, M. E., Cramer, K., Fischer, B., Förster, A., Galli, R., Kremer, F., Mapesa, E. U., Meissner, S., Preisinger, R., Preusse, G., Schnabel, C., Steiner, G., & Bartels, T. (2018). Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poultry Science*, 97(3), 749-757.

Kreuzer, M., Polta, S., Gapp, J., Schuler, C., Kochs, E.F. & Fenzl, T. (2015). Sleep scoring made easy—Semi-automated sleep analysis software and manual rescoring tools for basic sleep research in mice. *MethodsX*, 2, 232-240.

Maris, E. & Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG-and MEG-data. *Journal of neuroscience methods*, 164, 177-190.

Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1281–1289.

Mellor, D. J., & Diesch, T. J. (2006). Onset of sentience: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 100(1-2), 48-57.

Mellor, D. J., & Diesch, T. J. (2007). Birth and hatching: Key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *New Zealand Veterinary Journal*, 55(2), 51-60.

Mellor, D. J., Diesch, T. J., Johnson, C. B. (2009). Legal and animal welfare implications of when consciousness first appears in developing young and of the potential for delayed onset of increased pain sensitivity. *The Welfare of Animals – It's everyone's business. Proceedings of the Australian Animal Welfare Strategy International Conference, Conrad Jupiters, Gold Coast, Queensland, Australia.*

Mishra, A., Kumar, Y., Kumar, T., Singh, R. & Jha, K. (2019). Electroencephalographic characterization of a case of infantile spasm with atypical presentation. *Indian Journal of Child Health*, 6, 42-45.

Nath, T., Mathis, A., Chen, A. C., Patel, A., Bethge, M., & Mathis, M. W. (2019). Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nature Protocols*, 14(7), 2152-2176.

Peters, J. J., Vonderahe, A. R., & Huesman, A. A. (1960). Chronological Development of Electrical Activity in the Optic Lobes, Cerebellum, and Cerebrum of the Chick Embryo. *Physiological Zoology*, 33(3), 225-231.

Peters, J. J., Vonderahe, A. R., & Powers, T. H. (1956). The functional chronology in developing chick nervous system. *Journal of Experimental Zoology*, 133(3), 505-518.

Polta, S., Fenzl, T., Jakubcakova, V., Kimura, M., Yassouridis, A. & Wotjak, C. (2013). Prognostic and Symptomatic Aspects of Rapid Eye Movement Sleep in a Mouse Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 60.

Ring C., K.M., Willoughby A.R. (2013) Emotional modulation of pain-related evoked potentials. *Biological Psychology*, 93, 373-376.

Romanowski, C.P., Fenzl, T., Flachskamm, C., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M. & Kimura, M. (2010). Central deficiency of corticotropin-releasing hormone receptor type 1 (CRH-R1) abolishes effects of CRH on NREM but not on REM sleep in mice. *Sleep*, 33, 427-436.

Rosenbruch, M. (1997). The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 14(3), 111-113.

Schwitalla, J.C., Pakusch, J., Mücher, B., Brückner, A., Depke, D.A., Fenzl, T., De Zeeuw, C.I., Kros, L., Hoebeek, F.E. & Mark, M.D. (2022). Controlling absence seizures from the cerebellar nuclei via activation of the Gq signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79, 197.

Smith, E. S., & Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 195(12), 1089-1106.

Stacho, M., Herold, C., Rook, N., Wagner, H., Axer, M., Amunts, K., & Güntürkün, O. (2020). A cortex-like canonical circuit in the avian forebrain. *Science*, 369(6511), eabc5534.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	3
Abbildung 2	12
Abbildung 3	14
Abbildung 4	17
Abbildung 5	20
Abbildung 6	20
Abbildung 7	21
Abbildung 8	28
Abbildung 9	29
Abbildung 10	30
Abbildung 11	31
Abbildung 12	32
Abbildung 13	33
Abbildung 14	34
Abbildung 15	35
Abbildung 16	36
Abbildung 17	37
Abbildung 18	38
Abbildung 19	39
Abbildung 20	40
Abbildung 21	41
Abbildung 22	42
Abbildung 23	43
Abbildung 24	44
Abbildung 25	44
Abbildung 26	45
Abbildung 27	46
Abbildung 28	47
Abbildung 29	48
Abbildung 30	49
Abbildung 31	50
Abbildung 32	51
Abbildung 33	52

Abbildung 34	52
Abbildung 35	53
Abbildung 36	54
Abbildung 37	55
Abbildung 38	55
Abbildung 39	57
Abbildung 40	58
Abbildung 41	59
Abbildung 42	64

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	14
Tabelle 2	15
Tabelle 3	19
Tabelle 4	25
Tabelle 5	27
Tabelle 6	56