

**Untersuchung kardiovaskulärer und neurohumoraler
Parameter zur Evaluierung nozizeptiver Reaktionen beim
Hühnerembryo**

von Larissa Weiss

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung kardiovaskulärer und neurohumoraler Parameter
zur Evaluierung nozizeptiver Reaktionen beim Hühnerembryo

von Larissa Weiss

aus Starnberg

München 2025

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt am Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der
Technischen Universität München

Mentorin: Prof. Dr. Christine Baumgartner

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 08. Februar 2025

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung
für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in dieser Dissertationsschrift
enthalten:

**Nociception in Chicken Embryos, Part I: Analysis of
Cardiovascular Responses to a Mechanical Noxious Stimulus**

By Larissa Weiss ¹, Anna M. Saller ¹, Julia Werner ¹, Stephanie C. Süß ¹, Judith Reiser ¹,
Sandra Kollmansperger ², Malte Anders ², Heidrun Potschka ³, Thomas Fenzl ², Benjamin
Schusser ⁴ and Christine Baumgartner ^{1,5,*}

¹ Center for Preclinical Research, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675
Munich, Germany

² Clinic for Anesthesiology and Intensive Care, TUM School of Medicine, Technical University of
Munich, 81675 Munich, Germany

³ Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität München,
80539 Munich, Germany

⁴ Reproductive Biotechnology, TUM School of Life Sciences, Technical University of Munich, 85354
Freising, Germany

⁵ Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Germany

* Author to whom correspondence should be addressed

Animals 2023, 13(17), 2710; <https://doi.org/10.3390/ani13172710>

Submission received: 20 July 2023 / Revised: 18 August 2023 / Accepted: 23 August 2023 /

Published: 25 August 2023

Für Lotta

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT	5
1. Schmerz und Nozizeption	5
1.1. Schmerz bei Menschen und Tieren	5
1.2. Mechanismen der Nozizeption und Schmerzwahrnehmung mit Besonderheiten beim Vogel	8
1.2.1. Transduktion.....	9
1.2.2. Transmission	11
1.2.3. Modulation	13
1.2.4. Projektion	17
1.2.5. Perzeption.....	17
1.3. Schmerzerkennung bei Vögeln	19
1.4. Schmerz und Nozizeption bei Föten und Neonaten	23
1.5. Schmerz und Nozizeption beim Hühnerembryo – bisherige Datenlage	30
2. Kardiovaskuläre Parameter.....	36
2.1. Embryonalentwicklung des kardiovaskulären Systems	36
2.2. Blutdruck von Hühnerembryonen.....	37
2.2.1. Entwicklung des Blutdrucks beim Hühnerembryo	37
2.2.2. Messung des Blutdrucks beim Hühnerembryo	40
2.3. Herzfrequenz von Hühnerembryonen	41
2.3.1. Entwicklung der Herzfrequenz beim Hühnerembryo	41
2.3.2. Messung der Herzfrequenz beim Hühnerembryo	43
3. Neurohumorale Parameter.....	45
3.1. Katecholamine beim Vogel.....	45
3.2. Katecholamine beim Hühnerembryo	47
III. ERWEITERTER MATERIAL- UND METHODENTEIL – VERSUCHSAUFBAU NEUROHUMORALE PARAMETER	51
1. Vorbereitung der Hühnerembryonen	51
2. Versuchssetup	51
3. Probenanalyse.....	52

IV. PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE.....	53
1. Simple Summary	54
2. Abstract	54
3. Introduction	54
4. Materials and methods.....	56
4.1. Animals	56
4.2. Experimental Design	57
4.3. Analysis.....	59
5. Results	60
5.1. Increasing Arterial Pressure and Evolution of HR during Embryonic Development of the Chicken.....	60
5.2. Increase in MAP in Response to a Noxious Stimulus.....	60
5.3. Changes in HR in Response to a Noxious Stimulus	62
5.4. Reduction of Cardiovascular Response by Local Anesthesia.....	64
6. Discussion.....	65
7. Conclusions	70
8. References	70
9. S1 Appendix.....	77
V. ERWEITERTE STUDIENERGEBNISSE – NEUROHUMORALE PARAMETER.....	83
VI. ERWEITERTER DISKUSSIONSTEIL.....	85
1. Einfluss von Arrhythmien auf die Auswertung kardiovaskulärer Parameter.....	85
2. Neurohumorale Parameter als Indikatoren für Nozizeption beim Hühnerembryo	88
3. Limitationen der Studie.....	92
4. Ausblick.....	94
VII. ZUSAMMENFASSUNG	97
VIII. SUMMARY.....	99

IX. TABELLENVERZEICHNIS	101
1. Tabellen aus den Kapiteln II – III	101
2. Tabellen aus Kapitel IV	101
X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	103
XI. LITERATURVERZEICHNIS	105
XII. DANKSAGUNG.....	135

Zur besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ACG	Acoustocardiography/ Akustokardiographie
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5- methyl-4- isoxazolpropionsäure
ARAS	aszendierendes retikuläres Aktivierungssystem
AVMA	American Veterinary Medical Association
BCG	Ballistocardiography/ Ballistokardiographie
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bpm	beats per minute/Schläge pro Minute
CAM	Chorioallantoismembran
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMT	Katecholamin-O- methyltransferase
DAP	diastolic arterial pressure/diastolischer arterieller Blutdruck
DOPA	Dopamin
E	Epinephrin
ED	embryonic day/ Entwicklungstag
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EU	Europäische Union
FR	Formatio reticularis
G	Gauge
GABA	γ -Aminobuttersäure

HPLC	high pressure liquid chromatography/Hochleis- tungsflüssigkeitschromato- graphie
HR	heart rate/Herzfrequenz
IASP	International Association for the Study of Pain
kg	Kilogramm
l	Liter
LC	Locus coeruleus
MAO	Monoaminoxidase
MAP	mean arterial pressure/mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl
NE	Norepinephrin
NGF	nerve growth factor/Nervenwachstums- faktor
NK1	Neurokinin-1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
PAG	periaquäduktales Grau
pg	Pikogramm
PNS	peripheres Nervensystem
PPG	Photoplethysmographie
RAS	Renin-Angiotensin-System
RCOG	Royal College of Obstetricians & Gynaecologists
REM	rapid eye movement

RVM	rostrale ventromediale Medulla
SAP	systolic arterial pressure/systolischer arterieller Blutdruck
s	Sekunde
TierSchG	Tierschutzgesetz
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
WDR	wide dynamic range
ZNS	zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Tierschutz in Bezug auf Nutz- und Versuchstiere rückt in der heutigen Zeit immer mehr in den Vordergrund. Ein wichtiges Thema, das derzeit viel diskutiert wird, ist das Töten männlicher Eintagsküken. Da die Aufzucht und Vermarktung männlicher Nachkommen in der Legehennenindustrie nicht wirtschaftlich ist, werden die männlichen Küken direkt nach dem Schlupf durch Schreddern oder Begasen getötet und anschließend als Futterküken vermarktet (WEISSMANN et al., 2013). Der schlechte Fleischansatz und die schlechte Fleischqualität der männlichen Nachkommen ist ein weltweites Problem, das aus der Zucht ausschließlich auf Legeleistung der Legehennen resultiert. Folglich werden in der Europäischen Union (EU) jährlich ca. 330 Millionen männliche Küken getötet (VINCI, 2022). Bürgerumfragen in einigen europäischen Ländern bestätigen, dass die Gesellschaft Produkte bevorzugen würde, bei deren Herstellung keine männlichen Küken getötet werden (GANGNAT et al., 2018; REITHMAYER & MUßHOFF, 2019; DE HAAS et al., 2021). Während unter den Mitgliedsstaaten der EU noch Uneinigkeit besteht, haben Deutschland und Frankreich bereits ein Verbot des Tötens männlicher Küken gesetzlich verankert. In Deutschland ist seit Januar 2022 gemäß Tierschutzgesetz (TierSchG) das Töten der Küken von Haushühnern der Art *Gallus gallus* verboten (Gesetz zur Änderung des TierSchG, 2021). Als Alternativen zum Kükentöten kommen die Zucht von Zweinutzungshühnern und die Geschlechtsbestimmung im Ei mit anschließender Tötung der männlichen Embryonen in Frage (KRAUTWALD-JUNGHANNS et al., 2018; MURAWSKA et al., 2019). Nun stellt sich die Frage, ob die Tötung von Hühnerembryonen eine gerechtfertigte Alternative zum Kükentöten darstellt. Deutschland ist folglich einen Schritt weitergegangen und hat auch das Töten von Hühnerembryonen in das Verbot mit aufgenommen. Der ursprüngliche Gesetzesentwurf hatte ein Verbot des Tötens von Hühnerembryonen nach dem 6. Bruttag ab Januar 2024 vorgesehen (Gesetz zur Änderung des TierSchG, 2021). Zu den derzeit untersuchten Methoden der *in ovo* Geschlechtsbestimmung gehören endokrinologische (WEISSMANN et al., 2013) und molekulargenetische Analysen (CLINTON et al., 2016) der Allantoisflüssigkeit sowie optische Methoden wie die Hyperspektralanalyse des Gefieders (GÖHLER et al., 2017) oder die Raman-Spektroskopie (GALLI et al., 2016), bei der die in den extraembryonalen Gefäßen zirkulierenden Blutspektren

analysiert werden. Bisher ist jedoch keine dieser Methoden vor dem 7. Bruttag kommerziell anwendbar. Der Gesetzesentwurf basierte bis dato auf einer sehr lückenhaften wissenschaftlichen Datenlage zum Schmerzempfinden bzw. zur Nozizeption von Hühnerembryonen. Aus diesem Grund initiierte das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) ein Forschungsprojekt zur Untersuchung der Entwicklung der Nozizeption bzw. des Schmerzempfindens bei Hühnerembryonen, um die wissenschaftliche Datenlage zu verbessern und eine Entscheidungshilfe für eine mögliche Änderung des Gesetzesentwurfes zu haben. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Studie umfasst die Beurteilung kardiovaskulärer Parameter und ist ein Teil dieses Projektes, bei dem zudem Verhaltensparameter und die elektrische Hirnaktivität von Hühnerembryonen untersucht wurden.

Dass adulte Vögel genau wie Säugetiere die Fähigkeit zu Nozizeption und Schmerzempfinden besitzen, gilt als wissenschaftlich gesichert (GENTLE, 1992; SMITH & LEWIN, 2009; GENTLE, 2011). Auch geht man davon aus, dass Hühnerembryonen bereits im Ei die Fähigkeit zu Nozizeption und Schmerzempfinden erlangen (ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015; BJØRNSTAD et al., 2015). Ein genauer Zeitpunkt, wann diese Fähigkeit einsetzt, konnte bisher allerdings nicht genannt werden.

Grundsätzlich wird in der Schmerzforschung die unbewusste Signalweiterleitung, die sogenannte Nozizeption, von der bewussten Wahrnehmung von Schmerz unterschieden. Während Nozizeption die Aufnahme von noxischen (= tatsächlich oder potenziell gewebeschädigenden) Reizen und deren Weiterleitung durch das nozizeptive Nervensystem ist (JULIUS & BASBAUM, 2001; SNEDDON, 2018), zeichnet sich Schmerz durch eine subjektive, bewusste Sinnesempfindung, (meist) ausgelöst durch Nozizeption, aus (BELL, 2018; DOUGLAS et al., 2018). Das nozizeptive Nervensystem setzt sich aus den sensorischen Nervenfasern des peripheren Nervensystems (PNS), die über sog. Nozizeptoren noxische Reize registrieren, und den Nervenzellen und -bahnen des zentralen Nervensystems (ZNS) zusammen. Erst durch die subjektive, bewusste Wahrnehmung der Nozizeption entsteht Schmerz, der durch äußere Faktoren wie Stress oder Angst zusätzlich verstärkt werden kann (HENKE, 2012b). Voraussetzung für die Fähigkeit, Schmerzen zu empfinden, ist also sowohl ein funktionsfähiges Nervensystem, welches in der Lage ist, noxische Reize zu erkennen und

weiterzuleiten, als auch ein funktionsfähiges Gehirn, das in der Lage ist, die Reize adäquat zu verarbeiten (MELLOR & DIESCH, 2007).

Die Entwicklung des Hühnerembryos und dessen Nervensystems ist ein stufenweiser Prozess, der im Laufe der 21 Tage langen Bebrütungsdauer voranschreitet. Mehrere Veröffentlichungen stimmen dahingehend überein, dass Nozizeption und Schmerzempfindung im ersten Trimester der Embryonalentwicklung nicht möglich sind. 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 Inkubationstag 6,5 zeigt das Gehirn keine elektrische Aktivität (PETERS et al., 1956) und es kommt bis zum 7. Inkubationstag auch noch nicht zum Schluss von multisynaptischen Reflexbögen (EIDE & GLOVER, 1995; ROSENBRUCH, 1997; MELLOR & DIESCH, 2007), wodurch sowohl Reizweiterleitung als auch Reizverarbeitung nicht möglich sind. Darüber hinaus konnte aufgrund der lückenhaften wissenschaftlichen Datenlage bisher allerdings kein konkreter Zeitpunkt genannt werden, an dem die Fähigkeit zu Nozizeption und Schmerzempfinden einsetzt.

Auch zum Schutz von Hühnerembryonen in der Forschung wäre es vorteilhaft, das Einsetzen von Nozizeption und Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen näher eingrenzen zu können. Hühnerembryonen aller Entwicklungsstadien werden in der Forschung zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen vielfach eingesetzt. Insbesondere in den Bereichen der Entwicklungsbiologie, Toxikologie, Krebsforschung und Entwicklung von Arzneimitteln findet der Modellorganismus Hühnerembryo häufig Anwendung (RASHIDI & SOTTILE, 2009; SEABRA & BHOGAL, 2010). In der EU gelten Eingriffe an Hühnerembryonen zu Versuchszwecken, solange es nicht zum Schlupf der Tiere kommt, nicht als Tierversuch und werden sogar als „Replacement“-Methode zur Durchführung von Tierversuchen im Sinne des „3R“-Konzepts angesehen (Richtlinie 2010/63/EU). Es bestehen bisher keine gesetzlichen Vorschriften, Schmerzen, Leiden und Schäden, die den Hühnerembryonen im Verlauf eines Versuchs zugefügt werden, auf ein unerlässliches Maß zu beschränken (SEABRA & BHOGAL, 2010; ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015). Neben den fehlenden rechtlichen Vorschriften, die wenig organisatorischen Aufwand bedeuten, bieten Hühnerembryonen entscheidende Vorteile in der Forschung, darunter insbesondere ein schnelles Wachstum, eine geringe Größe und eine einfache Zugänglichkeit des

Organismus. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse über die Fähigkeit von Hühnerembryonen zu Nozizeption und Schmerzempfinden wären essenziell, um auch in der Forschung tierschutzgerechte Umgangsweisen mit Hühnerembryonen zu fördern.

Ziel dieser Studie war es, mittels objektiver klinischer Parameter und Laborparameter den Zeitraum zu bestimmen, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption bzw. die Fähigkeit entwickeln, aversive Sinneserlebnisse als Schmerzen zu empfinden. Die Ergebnisse der Studie sollten dem BMEL als wissenschaftliche Entscheidungshilfe bei einer möglichen Änderung des beschriebenen Gesetzesentwurfes dienen. Zunächst wurden in einer Vorstudie geeignete Parameter zur Messung nozizeptiver und schmerzassoziierter Reaktionen im Hühnerembryo identifiziert sowie geeignete Stimuli und Lokalisationen zur Induktion nozizeptiver und schmerzassoziierter Reaktionen im Hühnerembryo getestet. Anschließend wurde in der Hauptstudie mit Hilfe von hämodynamischen, labordiagnostischen und elektrophysiologischen Parametern sowie Verhaltensbeobachtungen der Zeitpunkt, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln und Schmerzen empfinden können, näher eingegrenzt. Die vorliegende Arbeit umfasst die Untersuchung der Fähigkeit von Hühnerembryonen zur Nozizeption anhand der Erhebung von kardiovaskulären (Blutdruck und Herzfrequenz) und neurohumoralen Parametern.

II. ERWEITERTE LITERATURÜBERSICHT

1. Schmerz und Nozizeption

1.1. Schmerz bei Menschen und Tieren

Biologisch betrachtet erfüllt Schmerz eine fundamentale Schutzfunktion vor potenziellen Gefahren (BELL, 2018). Die Fähigkeit, noxische (= potenziell oder tatsächlich gewebeschädigende) Reize zu erkennen, angemessen zu reagieren und sich in Zukunft vor ihnen zu schützen ist essenziell für das Überleben eines Organismus (SNEDDON et al., 2014; COOLEY, 2015). In der Forschung wird zwischen Schmerz und Nozizeption differenziert. Nozizeption umfasst die neuronale Erkennung, Weiterleitung und Verarbeitung eines noxischen Reizes im peripheren (PNS) und zentralen Nervensystem (ZNS) (SANN, 2004), was zur unmittelbaren Schadensminimierung führt (SNEDDON et al., 2014). Schmerz hingegen entsteht erst durch die kognitive und emotionale Verarbeitung in neuronalen Strukturen des Gehirns und resultiert in der bewussten Wahrnehmung eines unangenehmen Gefühls (JULIUS & BASBAUM, 2001; HELLYER et al., 2007). Hierdurch wird eine langfristige Schutzfunktion vor zukünftigen Gefahren gewährleistet (SNEDDON et al., 2014). Schmerz unterscheidet sich von anderen sensorischen Empfindungen durch sein subjektives und emotionales Wesen, das durch verschiedene äußere Faktoren wie Stress, Angst, Panik oder Erinnerungen beeinflusst werden kann (HENKE, 2012b). Er kann sogar ohne ersichtlichen externen Reiz auftreten (HELLYER et al., 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Schmerz ist stets subjektiv und kann weder gemessen noch mit einer Einheit quantifiziert noch von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden (HELLYER et al., 2007). Diese multidimensionalen Eigenschaften des Schmerzes werden in der offiziellen Definition der International Association for the Study of Pain (IASP) berücksichtigt, die zuletzt 2020 überarbeitet wurde. Sie definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung einhergeht oder einer solchen ähnelt“ (RAJA et al., 2020). Diese Definition basiert v. a. auf der subjektiven Beschreibung von Schmerz, d. h. der Selbstauskunft, die als Goldstandard zur Beurteilung von Schmerzen bei Menschen gilt (HELLYER et al., 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Obwohl die IASP in einem Nebensatz erwähnt, dass die

Unfähigkeit der verbalen Kommunikation das Schmerzempfinden nicht ausschließt (RAJA et al., 2020), ist diese Definition schwierig bei nonverbalen Organismen anwendbar (KLINCK & TRONCY, 2016).

Seit langem beschäftigen sich Wissenschaftler und Philosophen mit der Frage, ob Tiere Schmerzen auf ähnliche Weise wie Menschen wahrnehmen können (SNEDDON et al., 2014). Da es keinen einheitlichen Goldstandard zur Bewertung von Schmerzen bei Tieren gibt, kann die Wahrnehmung von Schmerzen nicht eindeutig nachgewiesen werden (HELLYER et al., 2007). Bisher wurde jedoch auch kein anatomischer oder physiologischer Grund gefunden, der das Gegenteil belegt (HENKE, 2012b). Außerdem wird oft das Argument angeführt, dass Schmerz ein wesentlicher Bestandteil der Evolution ist und Tiere ohne diese Fähigkeit nicht überleben könnten, da sie Gefahren nicht erkennen und sich ständig verletzen würden (SNEDDON et al., 2014). Erst durch die aversive emotionale und kognitive Komponente von Schmerz entwickeln Tiere die Motivation, Gefahren zu vermeiden und zu lernen, sich zukünftig besser vor Schäden zu schützen (BATESON, 1991; ELWOOD, 2011). SNEDDON et al. (2014) empfiehlt, ein Tier als fähig zur Schmerzperzeption anzusehen, wenn es bestimmte Kriterien als Voraussetzung für ein mögliches Schmerzempfinden erfüllt: 1. eine Reaktion des Tieres auf noxische Reize, die sich von einer Reaktion auf nicht-noxische Reize unterscheidet, einschließlich physiologischer Veränderungen und protektiver Verhaltensweisen. Diese Reaktion kann durch Analgetika und Lokalanästhetika reduziert werden. 2. eine langfristige Veränderung der Motivation eines Tieres, die durch schnelles Lernen und die Anpassung zukünftiger Entscheidungen gekennzeichnet ist. Beispiele hierfür sind die erlernte Selbstverabreichung von Analgetika, die konditionierte Ortspräferenz oder das Akzeptieren eines Preises, um ein Analgetikum zu erhalten. 3. das Vorhandensein neuronaler Strukturen, die für die Erkennung, Weiterleitung und Verarbeitung eines noxischen Reizes sowie die darauffolgende Reaktion erforderlich sind. Das Ergebnis vieler Studien legt nahe, dass zumindest die meisten Wirbeltiere, einschließlich Vögel, diese Kriterien erfüllen und daher zur Schmerzperzeption fähig sein sollten (SNEDDON et al., 2014). Dies führt zu einem wissenschaftlichen Konsens, dass Tiere zweifellos Schmerzen wahrnehmen können (ALLEN & TRESTMAN, 2024). Es ist jedoch zu beachten, dass die wissenschaftliche Datenlage bei einigen Tieren wie Arthropoden und Mollusken lückenhaft ist (SNEDDON et al., 2014).

Wissenschaftler versuchen seit langem, Definitionen von Schmerz zu formulieren, die besser auf Tiere zutreffen. Eine an Tiere angepasste Definition ist wesentlich, um Schmerzen bei Tieren soweit möglich zu erkennen, zu bewerten und zu lindern (SNEDDON et al., 2014). Am häufigsten wird auf die Definition von ZIMMERMAN (1986) verwiesen, der Schmerz bei Tieren als „aversive sensorische Erfahrung, die durch tatsächliche oder potenzielle Verletzung ausgelöst wird, protektive motorische und vegetative Reaktionen auslöst, zu einer erlernten Vermeidungsreaktion führt und artspezifisches Verhalten, einschließlich Sozialverhalten, modifizieren kann“ definiert (ZIMMERMAN, 1986). SNEDDON (2009) hat diese Definition durch Hinzufügen ergänzt, dass Tiere mit Schmerzen „schnell lernen, den noxischen Reiz zu vermeiden, und anhaltende Verhaltensveränderungen zeigen, die eine Schutzfunktion haben, um weitere Schäden und Schmerzen zu minimieren, vor einer wiederholten Verletzung zu schützen und die Heilung und Erholung zu fördern“. MOLONY und KENT (1997) implementieren in ihrer Definition zudem, dass das Tier sich eines Gewebeschadens oder einer Gefahr für die Integrität seines Körpers bewusst ist. Sie betonen ebenfalls, dass Schmerz Veränderungen von physiologischen und verhaltensassoziierten Parametern auslöst, um Schäden zu reduzieren, ein Wiederkehren zu vermeiden und die Erholung zu induzieren (MOLONY & KENT, 1997).

In der Schmerzforschung wird zwischen akutem und chronischem Schmerz unterschieden. Akuter Schmerz zeichnet sich durch einen zeitlich begrenzten, von inneren oder äußeren Prozessen ausgelösten und gut lokalisierbaren noxischen Stimulus aus und geht häufig mit vegetativen oder Angstreaktionen einher (HENKE, 2012b). Er erfüllt eine biologische Warnfunktion und induziert entsprechendes Meide- oder Schonverhalten (HELLYER et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist chronischer Schmerz ein anhaltender Schmerz, der über die normale Zeit des Heilungsprozesses einer Verletzung oder Krankheit hinausgeht. Er hat keine biologische Funktion, sondern ist selbst eine Pathologie und belastet den Organismus schwer (HELLYER et al., 2007). Außerdem kann zwischen oberflächlichem und tiefem Schmerz unterschieden werden. Oberflächlicher Schmerz wird durch noxische Reize auf der Haut ausgelöst, während sich tiefer Schmerz auf tiefe somatische und viszerale Strukturen bezieht (Muskeln, Gelenke, Eingeweide). Diese beiden Arten von Schmerz haben anatomisch und funktionell

getrennte Schmerzbahnen und unterscheiden sich in ihrer Sensibilität gegenüber Verletzungen (HELLYER et al., 2007).

Schmerz hat diverse Ätiologien und kann durch eine Vielzahl von mechanischen, thermischen, chemischen und entzündlichen Reizen oder auch durch eine Schädigung des Nervensystems selbst ausgelöst werden (BELL, 2018). Oftmals besteht Schmerz aus einer Kombination verschiedener Arten (KLINCK & TRONCY, 2016). Als nozizeptiver Schmerz wird der akute protektive Schmerz bezeichnet, der durch einen noxischen Stimulus ausgelöst wird (WOOLF, 2011), wobei Intensität und Dauer dem Stimulus entsprechen (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009). Als Reaktion werden protektive Verhaltensweisen wie das Zurückziehen eines Körperteils oder Meideverhalten induziert. Wenn trotz des nozizeptiven Schutzsystems Gewebe verletzt wird, tritt entzündlicher Schmerz auf. Dieser entsteht durch verletztes Gewebe oder Aktivierung von Immunzellen. Chemische Veränderungen im entzündeten Gewebe führen zu einer erhöhten Sensibilität der Nozizeptoren, wodurch auch andere nicht-noxische sensorische Reize als schmerzhaft wahrgenommen werden können (KLINCK & TRONCY, 2016). Neuropathischer Schmerz hingegen resultiert aus einer primären Verletzung oder Dysfunktion von Nerven (WOOLF, 2004). Sekundäre Veränderungen in Neuronen führen zu einer Hypersensibilität gegenüber normalerweise harmlosen Reizen. Funktionaler (idiopathischer) Schmerz entsteht ohne erkennbare Gewebe- oder Nervenschädigung (KLINCK & TRONCY, 2016). Diese Form des Schmerzes wird jedoch selten beim Tier diagnostiziert (PRICE & NOLAN, 2007).

1.2. Mechanismen der Nozizeption und Schmerzwahrnehmung mit Besonderheiten beim Vogel

Der Mechanismus der Nozizeption ist ein physiologischer Prozess, der in mehrere Komponenten eingeteilt werden kann und bei vollständigem Ablauf in der bewussten Schmerzwahrnehmung endet (HELLYER et al., 2007; HENKE, 2012a). Zunächst erfolgt die Signalaufnahme und Transduktion eines noxischen Stimulus in der Peripherie, dann dessen Transmission (Impulsweiterleitung) zum ZNS, gefolgt von der Modulation (Impulsabwandlung) des Signals und der Projektion (Weiterleitung) zum Gehirn, wobei es schließlich zur Perzeption (Wahrnehmung) von Schmerz kommt (HENKE, 2012a; BELL, 2018). Obwohl der Mechanismus der Schmerzentstehung bei Säugetieren umfassend erforscht ist, stammt das meiste Wissen über die Schmerzentstehung bei Vögeln aus der Analogie zu Säugetieren

(BEAUSOLEIL et al., 2022). Interessanterweise ist das wissenschaftliche Verständnis für die Schmerzwahrnehmung bei Fischen sogar ausgeprägter als bei Vögeln (WILLIAMS et al., 2019). Bisher wurden nur bei etwa 15 Vogelspezies Studien zu Nozizeption und Schmerzempfinden durchgeführt, wobei die meisten Studien sich auf Hühnervögel (*Galliformes*), Gänsevögel (*Anseriformes*), Taubenvögel (*Columbiformes*) und Papageienvögel (*Psittaciformes*) konzentrieren (MACHIN, 2005; BEAUSOLEIL et al., 2022). Obwohl der Mechanismus der Nozizeption bei diesen Arten gut etabliert ist, gibt es nur wenige Untersuchungen über die Verarbeitung noxischer Reize im Vogelgehirn. Bisher konnte die neuronale Verarbeitung noxischer Reize in höheren Hirnregionen bei Vögeln nicht mittels bildgebender Verfahren nachgewiesen werden (BEAUSOLEIL et al., 2022). Um emotionale und kognitive Aspekte von Schmerz zu untersuchen, werden häufig Verhaltensstudien an Hühnern herangezogen, die komplexe Verhaltensmuster, assoziatives Lernen und Motivationskonflikte nach noxischen Reizen sowie deren Veränderung durch Analgetika analysieren. Dies legt nahe, dass Hühner zur Empfindung aversiver Emotionen infolge noxischer Reize befähigt sind (BEAUSOLEIL et al., 2022).

1.2.1. Transduktion

Der initiierte Schritt der Nozizeption besteht in der Aktivierung von Nozizeptoren durch einen noxischen Stimulus (SANN, 2004). Nozizeptoren stellen verzweigte, nicht bekapselte freie Nervenendigungen dar, sind sensibel gegenüber noxischen Reizen und fungieren als periphere Enden primär afferenter Neurone (MACHIN, 2005; HELLYER et al., 2007). In ihrer Zellmembran befinden sich nichtselektive Kationenkanäle, die sich auf verschiedene Stimuli hin öffnen oder schließen können (DOUGLAS et al., 2018). Der Zellkörper dieser nozizeptiven Neurone ist in den Spinalganglien bzw. im Kopfbereich im Ganglion trigeminale lokalisiert und über ein peripheres Axon mit der Peripherie und über ein zentrales Axon mit dem Dorsalhorn des Rückenmarks verbunden (BELL, 2018). Diese pseudounipolare Struktur erlaubt eine bidirektionale Signalübertragung (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010). Nozizeptoren sind in fast allen Geweben des Körpers außer im Gehirn und Leberparenchym vorhanden, wobei die höchste Dichte in der Haut zu finden ist (SILBERNAGL & DESPOPOULOS, 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Sie können durch mechanische, thermische, elektrische oder chemische Stimuli aktiviert werden (HELLYER et al., 2007; KLINCK &

TRONCY, 2016). Die meisten Nozizeptoren sind polymodal und reagieren auf verschiedene Reizarten, während unimodale Nozizeptoren selektiv auf eine Reizart reagieren. Zudem wurde eine Gruppe von Nozizeptoren identifiziert, die unter physiologischen Bedingungen eine geringe Sensitivität gegenüber noxischen Reizen aufweist, bekannt als schlafende Nozizeptoren. Erst durch pathologische Zustände, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen, wird ihre Erregbarkeitsschwelle herabgesetzt, wodurch sie dann durch eine Vielzahl von mechanischen und thermischen Reizen aktiviert werden können (SANN, 2004; HELLYER et al., 2007). Die aktuelle wissenschaftliche Datenlage basiert größtenteils auf der Erforschung kutaner Nozizeptoren. Dennoch weisen Nozizeptoren je nach Lokalisation charakteristische Eigenschaften auf (JULIUS & BASBAUM, 2001). Während scharfe Schnitte und starker Druck Nozizeptoren in der Haut stimulieren, werden Nozizeptoren in Gelenken, Muskeln und den Eingeweiden hauptsächlich durch Überdehnung, Torsion, Spasmus oder Ischämie aktiviert (HELLYER et al., 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Viszeraler Schmerz ist im Gegensatz zu oberflächlichem Schmerz schlecht lokalisierbar, stumpf und tief (JULIUS & BASBAUM, 2001). Diese Unterschiede lassen sich darauf zurückführen, dass viszerale Strukturen hauptsächlich durch langsam leitende C-Fasern innerviert werden, wobei das Verhältnis von A δ - zu C-Fasern 1:10 beträgt. Im Gegensatz dazu beträgt dieses Verhältnis in somatischen Gebieten 1:2 (HELLYER et al., 2007).

Beim Vogel wurden drei Typen von Nozizeptoren identifiziert: polymodale hochschwellige mechanothermische und mechanochemische Nozizeptoren, Mechanonozizeptoren sowie Thermonozizeptoren (DUBBELDAM, 2009). Diese wurden in Haut, Gelenken, Skelettmuskeln, nasalen und oralen Epithelien sowie Schnabelstrukturen von Geflügel, Wassergeflügel und Staren identifiziert (DOUGLAS et al., 2018). Es wird angenommen, dass aviäre Nozizeptoren ähnliche Charakteristika wie die des Säugers aufweisen und sensibilisiert werden können (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; GENTLE, 2011), jedoch mit Unterschieden in der Sensitivität gegenüber Chemikalien und Temperaturen (BEAUSOLEIL et al., 2022). Thermische Nozizeptoren beim Vogel zeichnen sich durch eine höhere Hitzetoleranz (41 – 56 °C) und geringere Kältesensitivität aus, was auf die höhere Körpertemperatur im Vergleich zu Säugetieren zurückgeführt werden kann (WOOLLEY & GENTLE, 1987; MACHIN, 2005; DUBBELDAM, 2009;

DOUGLAS et al., 2018). Zudem reagieren aviäre Nozizeptoren nicht auf Capsaicin, das bei Säugetieren eine brennende Empfindung hervorruft (SNEDDON, 2018). Dies ist auf Unterschiede in der Sequenz des Vanilloidrezeptors 1 (TRPV1) zurückzuführen (DAVIS et al., 2000b; JORDT & JULIUS, 2002).

Die Erregbarkeit von Nozizeptoren wird sowohl von der Lokalisation und Art des Gewebes als auch von der Art und Intensität des Stimulus beeinflusst (KLINCK & TRONCY, 2016). Bei Erreichen eines bestimmten Schwellenwerts wandeln molekulare Strukturen in der Zellmembran des Nozizeptors die Energie des Stimulus (physikalisch, chemisch, mechanisch) in elektrische Energie um (Transduktion) (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; COOLEY, 2015). Dies führt zur Depolarisation der Membran durch den Fluss von Ionen entlang ihres Gradienten und zur Entstehung eines Aktionspotentials, welches entlang der afferenten Nervenfasern zum Rückenmark weitergeleitet wird (COOLEY, 2015; KLINCK & TRONCY, 2016). Eine spezielle Eigenschaft von Nozizeptoren ist ihre Sensibilisierung, die nicht nur bei akutem Schmerz, sondern auch bei pathologischen Schmerzzuständen eine Rolle spielt (JULIUS & BASBAUM, 2001). Verletzungen von Gewebe führen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und nachfolgend zur Sensibilisierung der Nozizeptoren (v. a. C-Fasern), was zur Hyperalgesie (Übererregbarkeit) und Allodynie (Wahrnehmung von nicht-noxischen Reizen als schmerzhaft) führt (SILBERNAGL & DESPOPOULOS, 2007; COOLEY, 2015). Dieser Prozess, als periphere Sensibilisierung bekannt, begünstigt den Heilungsprozess durch verstärkte Schonung der betroffenen Region (SANN, 2004). Zudem können aktivierte Nozizeptoren selbst Neuropeptide wie Substanz P oder Calcitonin gene-related peptide in der Peripherie freisetzen, wodurch es zu lokalen Entzündungsreaktionen kommt. Dieses Phänomen wird in der Schmerzforschung als neurogene Entzündung bezeichnet (SANN, 2004; BELL, 2018).

1.2.2. Transmission

Nach der Transduktion erfolgt die Weiterleitung des Signals entlang der afferenten Nervenfasern zum ZNS (COOLEY, 2015). Die primär afferenten Neurone variieren in ihrer Geschwindigkeit der Impulsweiterleitung, die durch den Durchmesser und den Grad der Myelinisierung bestimmt wird. Noxische Reize werden hauptsächlich durch zwei verschiedenen Typen von Axonen weitergeleitet, nämlich die A δ - und C-Fasern (BELL, 2018). A δ -Fasern sind myelinisiert, haben einen mittleren

Durchmesser und damit eine hohe Leitungsgeschwindigkeit und sind für den ersten Schmerz verantwortlich, der als gut lokalisierbar, schnell und scharf beschrieben wird (BELL, 2018). Diese A δ -Fasern lassen sich weiter in zwei funktionelle Gruppen unterteilen. Typ-I-Fasern reagieren auf mechanische und chemische Stimuli und haben einen höheren Schwellenwert für Hitze im Vergleich zu Typ-II-Fasern, es sei denn, sie sind sensibilisiert (KLINCK & TRONCY, 2016). Typ-I-Fasern vermitteln den ersten Schmerz von mechanischen Reizen wie Nadelstichen. Typ-II-Fasern hingegen weisen einen niedrigeren Schwellenwert für Hitzereize, aber einen höheren Schwellenwert für mechanische Reize auf. Sie sind somit an der schnellen Schmerzantwort auf Hitze beteiligt (KLINCK & TRONCY, 2016; BELL, 2018). Im Gegensatz zu den A δ -Fasern sind C-Fasern nicht myelinisiert und haben einen geringen Durchmesser, was zu einer langsameren Leitungsgeschwindigkeit führt (JULIUS & BASBAUM, 2001). Diese C-Fasern sind für den zweiten Schmerz verantwortlich, der als schlecht lokalisierbar, langsam, dumpf oder brennend beschrieben wird und bei Gewebeerletzung und Entzündung auftritt. Die meisten C-Fasern sind polymodal und werden durch mechanische, thermische und chemische Reize aktiviert (COOLEY, 2015). Darüber hinaus werden Haut, Muskeln und Gelenke von A β -Fasern innerviert, die myelinisiert sind, einen großen Durchmesser und somit eine hohe Leitungsgeschwindigkeit haben. Sie spielen physiologischer Weise keine Rolle bei der Schmerzentstehung, sondern übermitteln harmlose Reize wie Berührungen und Vibrationen und sind an der Propriozeption beteiligt (JULIUS & BASBAUM, 2001). Zudem können aktivierte A β -Fasern sogar durch die Aktivierung von hemmenden Interneuronen auf Rückenmarksebene die Schmerzwahrnehmung reduzieren (HELLYER et al., 2007).

Eine Übersicht über nozizeptive Nervenfasern bei Vögeln ist in Tabelle 1 gegeben. C-Fasern stellen den Großteil der aviären nozizeptiven Nervenfasern dar. Im Allgemeinen weisen die Nervenfasern bei Vögeln einen geringeren Durchmesser und dünnere Myelinscheiden auf, was zu einer geringeren Leitungsgeschwindigkeit im Vergleich zu Säugtieren führt (DOUGLAS et al., 2018). Die Leitungsgeschwindigkeit aviärer C-Fasern beträgt typischerweise 0,3 – 1 m/s, während sie bei aviären A δ -Fasern 5 – 40 m/s beträgt (WILD, 2022). C-Fasern machen den Großteil der aviären hochschwelligigen mechano-thermischen Nozizeptoren aus und differenzieren sich aus Mechanonozizeptoren mit einem

kleinen rezeptiven Feld, während A δ -Fasern aus Mechanonozizeptoren mit einem großen rezeptiven Feld hervorgehen (DOUGLAS et al., 2018). Auch Thermo- und Nozizeptoren können entweder A δ - oder C-Fasern hervorbringen (MACHIN, 2005). Schließlich enden A δ - und C-Fasern im Dorsalhorn des Rückenmarks bzw. in den Trigeminskernen für Nozizeptoren aus dem Kopfbereich, wo die Umschaltung vom ersten auf das zweite Neuron erfolgt (HENKE, 2012a; COOLEY, 2015). Die sensorischen Signale werden über einen synaptischen Spalt oder den Raum zwischen zwei Neuronen weitergeleitet und dann zum Gehirn projiziert (COOLEY, 2015).

Tabelle 1: Eigenschaften der wichtigsten nozizeptiven afferenten Nervenfasern beim Vogel (modifiziert nach HENKE (2012a) und DOUGLAS et al. (2018)).

Art	Eigenschaften	Stimulation	Schmerzcharakter	Folge
A δ	Myelinisiert Durchmesser < 3 μ m Hohe Leitungsgeschwindigkeit: 5 – 40 m/s	Mechanisch Thermisch	Scharfer Schmerz Kurz Exakte Lokalisation	v. a. Abwehr- und Fluchreflexe
C	Nicht myelinisiert Durchmesser < 1 μ m Niedrige Leitungsgeschwindigkeit: 0,3 – 1 m/s Häufigste Art der Nervenfaser	Polymodal (mechanisch, thermisch, chemisch)	Dumpfer Schmerz Anhaltend Schwierig zu lokalisieren	v. a. tonische Muskelanspannung vegetative Veränderungen

1.2.3. Modulation

Das Signal kann während seiner Weiterleitung zum Gehirn an mehreren Schaltstellen moduliert werden (Nozizeptoren, Rückenmark, Medulla oblongata, Thalamus) (SILBERNAGL & DESPOPOULOS, 2007), wobei das Dorsalhorn des Rückenmarkes eine entscheidende Rolle bei dieser Modulation spielt (CORTELLI et al., 2013). Nozizeptive Signale können durch aufsteigende Bahnen sowie Neurone aus höheren Hirnregionen beeinflusst werden. Diese aktivieren Modulationszentren im Hirnstamm und Hypothalamus, die dann wiederum absteigende Bahnen zum Dorsalhorn senden, um das Signal zu hemmen oder zu verstärken, bevor es weitergeleitet wird (HELLYER et al., 2007; CORTELLI et al., 2013). Obwohl das Rückenmark von Vögeln dem der Säugetiere anatomisch ähnlich ist, gibt es einige Unterschiede. Eine Besonderheit ist, dass Vögel keine Cauda equina haben und ihr Rückenmark über die gesamte Länge des Wirbelkanals verläuft. Darüber hinaus können die Enden der primär afferenten Neurone bei Vögeln über mehrere Wirbelsegmente verteilt sein, während sie bei Säugetieren am

dichtesten auf Höhe des Eintritts der Neurone lokalisiert sind (DOUGLAS et al., 2018). Die graue Substanz des Rückenmarks ist basierend auf der Größe und Verteilung von Zellen beim Säuger in 10, beim Huhn in 6 Schichten unterteilt, die als Rexed-Laminae bezeichnet werden (HOLLOWAY et al., 1980; BELL, 2018). Die Laminae sind in ihrer Anordnung spezifisch für jede Vogelart. Einige wie Tauben und Spärlinge weisen ähnliche dorsoventral angeordnete Schichten wie Säugetiere auf, während andere wie Hühner seitlich angeordnete Laminae besitzen (DOUGLAS et al., 2018). In den Laminae I und II enden hauptsächlich A δ - und C-Fasern, während A β -Fasern vorwiegend in den tieferen Laminae III und IV terminieren (COOLEY, 2015). In Lamina V befinden sich die sogenannten „wide dynamic range“ (WDR) -Neurone, die sowohl noxische als auch nicht-noxische Stimuli weiterleiten (HELLYER et al., 2007). Diese Neurone reagieren auf noxische Stimuli mit einer erhöhten Entladungsfrequenz und spielen eine wichtige Rolle bei der spinalen Verstärkung des Schmerzsignals und der Entstehung von chronischen Schmerzen (HELLYER et al., 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Außerdem erhalten WDR-Neurone Impulse sowohl von viszeralen nozizeptiven Fasern als auch von sensorischen Fasern der Haut, wodurch sich die viszerosomatische Konvergenz erklären lässt, d. h., dass viszerale noxische Reize als Schmerzen in bestimmten Regionen der Haut wahrgenommen werden (SANN, 2004).

Die synaptische Übertragung im Dorsalhorn erfolgt durch die Freisetzung von Neurotransmittern durch primär afferente Neurone, wobei Glutamat als primärer exzitatorischer Neurotransmitter fungiert (MUIR & WOOLF, 2001). Neurone der zweiten Ordnung umfassen exzitatorische Interneurone, die v. a. Glutamat als Neurotransmitter benutzen, und inhibitorische Interneurone, die γ -Aminobuttersäure (GABA) und/oder Glyzin verwenden, sowie ascendierende Neurone zum Gehirn, intersegmentale und projizierenden Neurone und α -Motorneurone, die bei reflexiven Wegziehreaktionen beteiligt sind (KLINCK & TRONCY, 2016; BELL, 2018). Glutamat wirkt exzitatorisch und bindet an drei Arten von inotropen Rezeptoren: den Kainat-Rezeptor, den α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA) -Rezeptor und den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptor. Außerdem kann es an metabotrope Glutamat-Rezeptoren binden. Zu den exzitatorischen Neurotransmittern gehört auch Substanz P, die an den Neurokinin-1 (NK1) -Rezeptor bindet und beim Vogel eine große Rolle spielt

(ZHAI & ATSUMI, 1997; KLINCK & TRONCY, 2016). GABA wirkt inhibitorisch, indem es durch Bindung an GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren die neuronale Erregbarkeit sowohl prä- als auch postsynaptisch herabsetzt. Auch Glyzin ist ein primär inhibitorischer Neurotransmitter, wobei es auch als Co-Agonist mit Glutamat an NMDA-Rezeptoren wirkt. Zudem wirkt Enkephalin hemmend an spannungsabhängigen Calciumkanälen (KLINCK & TRONCY, 2016). Monoamine wie Serotonin und Norepinephrin (NE) können außerdem exzitatorische Neurotransmitter hemmen sowie inhibitorische Neurotransmitter unterstützen (COOLEY, 2015). Darüber hinaus können endogene Opioide (Endomorphin, Enkephalin, Dynorphin) die synaptische Übertragung hemmen, indem sie an Opioidrezeptoren binden (SANN, 2004). Eine Vielzahl dieser Rezeptoren (μ , δ , κ) sowie α_2 -Adrenozeptoren befindet sich sowohl an der prä- als auch postsynaptischen Membran und ihre Aktivierung reduziert die Freisetzung von Neurotransmittern und hemmt die Aktivierung von Neuronen zweiter Ordnung (KLINCK & TRONCY, 2016). WAN und PANG (1994) haben außerdem beim Huhn Bindungsstellen für Melatonin im Dorsalhorn identifiziert und nehmen an, dass Melatonin eine Rolle bei der Modulation von Temperatur, viszeralen und autonomen Funktionen sowie Schmerzsignalen spielt. Synapsen im Dorsalhorn sind durch eine aktivitätsabhängige Plastizität gekennzeichnet (BELL, 2018). Anhaltende oder hochgradige noxische Stimuli wie z. B. bei Entzündungsgeschehen setzen die Erregbarkeitsschwelle zentraler Neurone herab, wodurch es folglich zu Hyperalgesie und Allodynie kommt. Außerdem werden durch die anhaltende nozizeptive Stimulation zusätzliche Nervenfasern aktiviert, wodurch sich der Schmerz auf umliegende nicht verletzte Regionen ausbreitet (DOUGLAS et al., 2018). Dieses Phänomen wird als zentrale Sensibilisierung bezeichnet (SANN, 2004; BELL, 2018).

Auch im Ventralhorn und der intermediären Zone des Rückenmarks befinden sich Interneurone, die für die Skelettmuskelfunktion und viszerale Steuerung wichtig sind sowie Informationen zu höheren Zentren des Gehirns weiterleiten (COOLEY, 2015). Durch Aktivierung der motorischen Systeme des ipsi- oder kontralateralen Ventralhorns können nozifensive Reflexe ausgelöst werden. Durch Modulation der präganglionären sympathischen Neurone im Seitenhorn können sympathische Reflexe ausgelöst werden. Somit sind lokale spinale Mechanismen auch für die motorischen und vegetativen Komponenten der Nozizeption verantwortlich

(SANN, 2004).

Die Modulation des nozizeptiven Signals erstreckt sich nicht nur auf lokale Mechanismen (Sensibilisierung) und intersegmentale Verschaltungen, sondern auch auf absteigende Bahnen aus dem ZNS (SANN, 2004). Kognitive, emotionale und autonome Mechanismen beeinflussen die Modulation des Signals im Dorsalhorn (BELL, 2018), indem sie es entweder hemmen (antinozizeptiv) oder verstärken (pronozizeptiv) (KLINCK & TRONCY, 2016). Verschiedene physiologische und pathologische Faktoren wie Stress, Angst, Schmerz oder Aktivierung der Opioidrezeptoren können eine absteigende Hemmung auslösen (SANN, 2004). Ein typisches Beispiel für antinozizeptive Effekte ist die akute „fight or flight“-Situation (BELL, 2018). Die absteigenden Bahnen, die für die Modulation des nozizeptiven Signals verantwortlich sind, entspringen verschiedenen Regionen des Gehirns, einschließlich des Kortex, des Thalamus und des Hirnstamms. Das periaquäduktale Grau (PAG) und der Nucleus raphe magnus der rostralen ventromedialen Medulla (RVM) spielen dabei eine besondere Rolle (HELLYER et al., 2007; KLINCK & TRONCY, 2016). Das PAG wird von Regionen im Kortex, Amygdala, Hypothalamus (WIESE & YAKSH, 2015) sowie von aufsteigenden nozizeptiven Bahnen aktiviert (HELLYER et al., 2007) und ist mit der RVM und dem Locus coeruleus (LC) verbunden, von denen Nervenfasern bilateral zum Dorsalhorn absteigen (BELL, 2018). Die Axone setzen vor allem die Neurotransmitter Serotonin und NE sowie endogene Opiode frei, welche die Aktivität der Interneurone modulieren (COOLEY, 2015). Während NE und Opiode starke antinozizeptive Effekte haben, kann Serotonin sowohl anti- als auch pronozizeptiv wirken, wobei insbesondere bei Jungtieren die pronozizeptiven Effekte überwiegen (BELL, 2018). Das endogene Opioidsystem spielt auch beim Vogel eine große Rolle bei der Modulation des Signals. μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren wurden im Vorder- und Mittelhirn sowie im Rückenmark diverser Spezies nachgewiesen (MACHIN, 2005; DOUGLAS et al., 2018). Im Vorder- und Mittelhirn des Huhns sind μ -Rezeptoren in größter Anzahl vertreten (DOUGLAS et al., 2018). Sie sind bereits beim Embryo ab dem 10. Embryonaltag besonders in Regionen, die für das Gedächtnis und die Verarbeitung sensorischer Informationen wichtig sind, vorhanden (HENDRICKSON & LIN, 1980). Ebenso wurden α_2 -Adrenozeptoren beim Huhn mit einer ähnlichen Verteilung wie beim Säuger nachgewiesen (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1997).

1.2.4. Projektion

Das auf Rückenmarksebene modulierte nozizeptive Signal wird anschließend durch spezifische nozizeptive projizierende Neurone weitergeleitet. Die Axone dieser Neurone verlaufen ipsi- oder kontralateral in den aufsteigenden Bahnen der spinalen weißen Substanz zu verschiedenen Zielgebieten im Gehirn (WIESE & YAKSH, 2015; BELL, 2018). Die an der Projektion des nozizeptiven Signals beteiligten Bahnen variieren je nach Spezies (BELL, 2018). Beim Vogel ist der Tractus spinothalamicus die vorrangige Bahn zur Übertragung nozizeptiver Signale. Er zieht zu den Thalamuskernen (DOUGLAS et al., 2018).

1.2.5. Perzeption

Die Perzeption, das Erkennen und Verarbeiten sensorischer Informationen, findet in verschiedenen Gehirnregionen statt, die über Interneurone miteinander verbunden sind, um schließlich eine Reaktion auf den noxischen Reiz zu generieren. Dieses komplexe Zusammenspiel umfasst somatosensorische Eingänge und Informationen über den Wachheitszustand sowie autonome und motorische Funktionen (WIESE & YAKSH, 2015). Der Thalamus fungiert als zentrale Integrationsstelle für die Weiterleitung der Signale an höhere Hirnregionen und die Koordinierung von Reaktionen (WIESE & YAKSH, 2015). Die Wahrnehmung von Schmerz beim Menschen kann in verschiedene Komponenten unterteilt werden. Der somatosensorische Kortex ist für die sensorisch-diskriminative Schmerzerkennung verantwortlich, die Informationen über Art, Intensität, Dauer und Lokalisation des noxischen Stimulus umfasst (HELLYER et al., 2007). Die motiviert-affektive Komponente des Schmerzes, die den subjektiven und emotionalen Aspekt darstellt, wird von den unspezifischen Thalamuskernen, der Formatio reticularis (FR) und dem Limbischen System verarbeitet (SANN, 2004). Die kognitiv-evaluative Komponente, die Bewusstsein, Erinnerung, logisches Denken, soziale und kulturelle Werte sowie Konditionierung mit einbezieht, ist das Ergebnis höherer kortikaler Aktivität (HELLYER et al., 2007).

Des Weiteren werden in verschiedenen Hirnregionen, einschließlich Thalamus, Hypothalamus, Amygdala und Hirnstamm, motorische und vegetative Reaktionen ausgelöst. Diese Hirnregionen werden auch als subkortikale Reflexzentren bezeichnet (BEAUSOLEIL et al., 2022). Motorische Reaktionen umfassen Ausweichbewegungen, das Zurückziehen eines Körperteils sowie Bewegungen von Kopf und Augen zur schmerzhaften Stelle („visual grasp reflex“) (SANN, 2004;

HELLYER et al., 2007). Autonome Reaktionen werden im Hypothalamus koordiniert, indem der Sympathikus und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse aktiviert werden, was folglich zur Freisetzung von Katecholaminen und Glucocorticoiden führt (HELLYER et al., 2007). Die FR reguliert Herz- und Atemfrequenz und ist für typische vegetative Reaktionen auf noxische Reize wie die Erhöhung von Herz- und Atemfrequenz, die Erhöhung des Herzzeitvolumens und die Umverteilung der Durchblutung verantwortlich (SANN, 2004; COOLEY, 2015). Die FR erhält zudem sensorische Informationen von afferenten Fasern aller Sinnesorgane. Sie bestimmt durch Verbindungen zu Kortex, Limbischem System und Hypothalamus die mentale Aufmerksamkeit und den Wachheitsgrad, weshalb dieses unspezifische System auch als aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem (ARAS) bezeichnet wird (HELLYER et al., 2007; SILBERNAGL & DESPOPOULOS, 2007). Dies erklärt die erhöhte Aufmerksamkeit und die Aufrechterhaltung des Bewusstseins bei noxischen Reizen (HELLYER et al., 2007).

Die Interaktion verschiedener Hirnregionen, die an der Schmerzperzeption beteiligt sind, wird oft als Schmerzmatrix bezeichnet (BELL, 2018). Diese Regionen sind nicht ausschließlich für die Verarbeitung von nozizeptiven Signalen spezifisch, sondern sind auch in die Verarbeitung von anderen sensorischen Informationen und von Verhaltensweisen involviert (TRACEY & JOHNS, 2010).

Es besteht ein breiter wissenschaftlicher Konsens, dass die Perzeption von Schmerz bei Tieren ähnlich aufgebaut ist wie beim Menschen (PRICE & NOLAN, 2007). Es wird angenommen, dass Tiere eine vergleichbare Fähigkeit zur kognitiven und emotionalen Verarbeitung von Schmerz haben, obwohl die kognitiv-evaluative Komponente möglicherweise bei niederen Säugetieren vom Menschen abweicht (HELLYER et al., 2007). Zudem wird angenommen, dass Tiere stärker auf die Intensität des Schmerzes fokussiert sind (PRICE & NOLAN, 2007). Aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge wird angenommen, dass Vögel trotz einiger Unterschiede zum Säugetier über die erforderlichen neuronalen Komponenten zur Verarbeitung von noxischen Reizen verfügen (DOUGLAS et al., 2018). Bisher konnten jedoch keine spezifischen Strukturen identifiziert werden, die an der aviären Schmerzmatrix beteiligt sind, da sich das aviäre Vorderhirn anatomisch und histologisch vom Vorderhirn der Säugetiere unterscheidet (DUBBELDAM, 2009; DOUGLAS et al., 2018; WILLIAMS et al., 2019). Der

Hauptunterschied liegt in dem Fehlen eines laminar geschichteten Cortex cerebri (GÜNTÜRKÜN, 2012). Stattdessen besteht das aviäre Großhirn aus großen Kernansammlungen (SHANAHAN et al., 2013). Trotz dieser Unterschiede besitzt das aviäre Vorderhirn Gebiete, die funktionale Homologien zum Kortex der Säugetiere aufweisen. Sie stellen das aviäre Pallium dar (GÜNTÜRKÜN, 2012). Ähnlich wie der Kortex der Säugetiere ist das aviäre Pallium an der kognitiven Verarbeitung und der Entstehung von Verhaltensweisen beteiligt (NORTHCUTT & KAAS, 1995; MEDINA & REINER, 2000; KUENZEL, 2007; JARVIS, 2009). Das Nidopallium caudolaterale der Vögel übernimmt dabei die Aufgaben des präfrontalen Kortex der Säugetiere, einschließlich exekutiver und anderer höherer kognitiver Funktionen (GÜNTÜRKÜN, 2012). Außerdem ist beschrieben, dass das aviäre Striatum, das somatosensorische Information vom Thalamus erhält, ähnliche Funktionen in der sensorischen Verarbeitung ausführt wie der Neokortex beim Säugetier (JARVIS et al., 2005). Ähnliche neuronale Verbindungen zwischen Hirnregionen, die an der sensorischen Verarbeitung sowie an exekutiven und motorischen Funktionen beteiligt sind, wurden außerdem bei Tauben identifiziert (SHANAHAN et al., 2013). In einer Studie von PAUL-MURPHY et al. (2007) wurden zudem bei Papageien Regionen des Großhirns identifiziert, die an der zentralen Verarbeitung eines anhaltenden noxischen Stimulus (experimentell induzierte Arthritis) beteiligt sind, basierend auf dem regionalen Glucose-Metabolismus. Die aktuelle Literatur legt nahe, dass das Vorderhirn von Vögeln und Säugetieren eine vergleichbare Funktionalität in Bezug auf höhere kognitive Funktionen und die Verarbeitung sensorischer Information aufweist. Dies deutet darauf hin, dass Vögel ähnlich wie Menschen zur kognitiven und emotionalen Verarbeitung von Schmerz fähig sind (GÜNTÜRKÜN, 2012; DOUGLAS et al., 2018).

1.3. Schmerzerkennung bei Vögeln

Angesichts der hochkomplexen und multidimensionalen Natur von Schmerz gestaltet sich die Schmerzbeurteilung selbst bei verbal kommunizierenden Menschen kompliziert. Selbst bei gleicher Intensität und Dauer noxischer Stimuli wird von verschiedenen Individuen nicht der gleiche Schmerzgrad wahrgenommen (HELLYER et al., 2007). Die Erkennung von Schmerzen bei Tieren und nonverbalen Menschen stellt eine besondere Herausforderung dar, da der Goldstandard der Selbstauskunft nicht anwendbar ist (HELLYER et al., 2007). Die

Beurteilung von Schmerzen bei Tieren beruht immer auf der subjektiven Interpretation von Verhaltensweisen, die der Mensch mit Schmerzen assoziiert, und wird von individueller Wahrnehmung, Voreingenommenheit und philosophischen Überzeugungen des Beurteilenden beeinflusst (PRICE & NOLAN, 2007). Um Verhaltensveränderungen zu identifizieren, die auf mögliche Schmerzen hinweisen, ist eine gründliche Kenntnis des physiologischen Verhaltens der jeweiligen Tierart erforderlich (PRICE & NOLAN, 2007). Allerdings variieren Reaktionen auf noxische Stimuli stark zwischen verschiedenen Spezies und sogar innerhalb derselben Spezies (HELLYER et al., 2007). In der Veterinärmedizin wird eine positive Reaktion auf eine analgetische Therapie als bester Indikator für die Diagnose von Schmerzen angesehen (PRICE & NOLAN, 2007). Im Zweifel erfolgt eine Beschreibung von Schmerzen bei Tieren jedoch anthropozentrisch, d. h. ein Reiz wird als schmerzhaft angesehen, wenn er zu Verhaltensweisen führt, die schmerzhaften Zuständen bei Menschen ähneln (SANN, 2004; WIESE & YAKSH, 2015). Zumindest bei Säugetieren scheint diesbezüglich eine gute Vergleichbarkeit zu bestehen (WIESE & YAKSH, 2015). Die Beurteilung von Schmerzen bei Vögeln ist hingegen besonders herausfordernd, da sie dazu neigen, Schmerzen nicht offensichtlich zu zeigen, um keine Schwäche gegenüber potenziellen Feinden zu offenbaren (HENKE, 2012b; DOUGLAS et al., 2018). Während in der veterinärmedizinischen Praxis bei Haustieren wie Hunden, Katzen und Pferden angepasste Schmerzbeurteilungsskalen aus der Humanmedizin mit größtmöglicher Objektivierung angewendet werden, wurden solche Bewertungssysteme für Vögel noch nicht validiert (HENKE, 2012b; KATA et al., 2015).

Obwohl eine direkte Messung von Schmerzen nicht möglich ist, können bestimmte Reaktionen auf noxische Stimuli analysiert werden, um Aussagen über die Nozizeption zu treffen (XIE, 2011). Diese nozifensiven Reaktionen sind unmittelbare autonome Antworten auf noxische Stimuli, die darauf abzielen, den Organismus vor Gefahren zu schützen und die Homöostase wiederherzustellen. Diese in den subkortikalen Reflexzentren (Hirnstamm, Hypothalamus, Thalamus, Amygdala) koordinierten Reaktionen umfassen hauptsächlich Veränderungen von Verhalten und physiologischen Parametern (CORTELLI et al., 2013). Sie werden als pseudoaffektive Reaktionen bezeichnet (SANN, 2004). Gemäß SANN (2004) lassen sich durch die Untersuchung der Nozizeption und des Verhaltens der Tiere indirekt Rückschlüsse auf ein mögliches Schmerzempfinden ziehen.

Veränderungen im Verhalten umfassen in erster Linie motorische Reflexe (Rückzugsreflex), protektive Reaktionen sowie Vokalisation (CORTELLI et al., 2013; BAKER et al., 2019). Nozifensive Verhaltensreaktionen wurden bei Vögeln nach thermischer und elektrischer Stimulation sowie mechanischen Reizen wie dem Kneifen des Kamms oder dem Ausreißen von Federn festgestellt (MACHIN, 2005; BEAUSOLEIL et al., 2022) und wurden auch unter Anästhesie beobachtet (MACHIN & LIVINGSTON, 2002). Viele Studien untersuchten auch komplexe und langanhaltende Verhaltensmuster und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren, um Hinweise auf die kognitiven und emotionalen Aspekte von Schmerz zu erhalten (BEAUSOLEIL et al., 2022). Es wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung höherer Hirnregionen mit zunehmender Komplexität der Verhaltensmuster steigt (BATESON, 1991). Allerdings wurden einige komplexe Verhaltensweisen wie koordinierte Fluchtbewegungen auch bei Hühnern ohne Vorderhirn beobachtet (GENTLE & WOOD-GUSH, 1976; GENTLE, 1981; GENTLE et al., 1997), weshalb davon auszugehen ist, dass sie im Hirnstamm ohne die Prozessierung in höheren Hirnregionen koordiniert werden (BEAUSOLEIL et al., 2022). Eine größere Aussagekraft hinsichtlich der Schmerzperzeption könnten jedoch Studien über Motivationskonflikte sowie assoziatives Lernen und Gedächtnis haben, da hierfür höchstwahrscheinlich eine Prozessierung in höheren Hirnregionen notwendig ist (BEAUSOLEIL et al., 2022). Es wurde beobachtet, dass bestimmte Umstände wie Fasten (Hunger) oder eine unbekannte Umgebung (Erkundungsverhalten) die Reaktivität auf noxische Stimuli vorübergehend reduzieren können (aufmerksamkeitsbedingte Analgesie). Dies wird vermutlich durch endogene Opiode vermittelt (GENTLE & CORR, 1995; GENTLE & TILSTON, 1999; BAKER et al., 2019). Darüber hinaus zeigten DANBURY et al. (2000), dass Masthühner mit Lahmheit bevorzugt ein farblich markiertes Futter wählten, das mit einem nicht steroidalen Antiphlogistikum versetzt war. Auch Legehennen mit verheilten Brustbeinfrakturen bevorzugten einen Ort, den sie mit der Injektion eines Opioids assoziierten (NASR et al., 2013).

Veränderungen physiologischer Parameter nach noxischen Stimuli werden im Kreislauf- und Atemzentrum, in den hypothalamischen Regionen für neuroendokrine Funktionen und im Limbischen System ausgelöst (HELLYER et al., 2007). Es kommt initial zu Hyperventilation, erhöhtem Sympathikustonus und vermehrter Freisetzung von Katecholaminen und anderen Hormonen. Folglich

erhöht sich die Herzauswurfleistung, die Herzfrequenz (HR), der periphere Widerstand (Vasokonstriktion), der Blutdruck und der myokardiale Sauerstoffverbrauch. Darüber hinaus tritt ein kataboler Zustand auf, um Energie für zentrale Organe und verletzte Gewebe bereitzustellen. Es werden vermehrt katabole Hormone und Stoffe wie Cortisol, Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Glukagon, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Renin und antidiuretisches Hormon ausgeschüttet, während die Freisetzung anaboler Hormone wie Insulin reduziert wird. Dies führt zu Hyperglykämie, erhöhten Konzentrationen an freien Fettsäuren, Laktat, Ketonen und Cortisol, reduzierter gastrointestinaler Motilität, Retention von Wasser und Natrium sowie vermehrter Ausscheidung von Kalium (HELLYER et al., 2007; KATA et al., 2015). Diese Reaktionen können durch die Messung hämodynamischer Parameter oder die Bestimmung von Blutwerten erfasst werden (HENKE, 2012b). Veränderungen in Blutdruck und HR werden unter Anästhesie als Methode der Wahl zur Bestimmung des Analgetikabedarfs herangezogen (RUÍZ-LÓPEZ et al., 2020). Bei Vögeln wurden ebenfalls Veränderungen von Blutdruck, HR und Atemfrequenz sowie Blutwerten nach verschiedenen noxischen Reizen festgestellt (BEAUSOLEIL et al., 2022). Beispielsweise wurde bei Hühnern nach mechanischer (Kneifen) oder thermischer Stimulation (50 °C für 10 s) des Kammes ein signifikanter Anstieg von HR, Atemfrequenz und Blutdruck beobachtet (WOOLLEY & GENTLE, 1987). Nach dem Ausreißen von Federn wurde ebenfalls ein Anstieg des Blutdrucks und Veränderungen der HR festgestellt (GENTLE & HUNTER, 1991). Ähnliche Veränderungen wurden auch nach dem Schnabelkürzen bei Hühnern (GLATZ & LUNAM, 1994) und nach mechanischer Stimulation bei Stockenten beobachtet (MACHIN & LIVINGSTON, 2002). Zudem wurden in einer Studie von DAVIS et al. (2004) nach Schnabelkürzen bei Hühnern über mehrere Stunden bis Wochen erhöhte Plasmakonzentrationen von Kortikosteron, welches als Indikator für akuten Stress beim Vogel beschrieben ist (BEUVING & VONDER, 1978; DAVIS et al., 2000a), festgestellt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen MONEVA et al. (2008), die erhöhte Kortikosteron- und Glukosekonzentrationen nach subkutaner Formalininjektion bei Hühnern beobachtet haben.

Obwohl Veränderungen physiologischer Parameter hilfreiche Daten zur Beurteilung der Nozizeption liefern können, sind sie allein nicht spezifisch für nozifensive Reaktionen. Ähnliche Veränderungen können durch nicht-noxische

Stressoren ausgelöst werden, die das autonome Nervensystem beeinflussen (ZIMMERMAN, 1986; HELLYER et al., 2007; PRICE & NOLAN, 2007; HENKE, 2012b). Insbesondere bei Vögeln können externe Faktoren wie Angst, Krankheit, Geräusche, Licht, Handling, Medikamente (z. B. Anästhetika und Analgetika) oder metabolische Störungen (z. B. Hyperthermie) schnell zu Veränderungen physiologischer Variablen führen (PAUL-MURPHY & LUDDERS, 2001; WIESE, 2015). Es ist auch zu beachten, dass eine Stressreaktion bereits durch die Messmethode selbst (z. B. Venenpunktion) ausgelöst werden kann (HENKE, 2012b). Des Weiteren ist zu bedenken, dass die Reaktivität auf noxische Stimuli durch wiederholte Stressoren oder noxische Stimuli vorübergehend reduziert werden kann (Stress-induzierte Analgesie). Dies wird vermutlich durch endogene Opiode vermittelt (GENTLE et al., 1989). Zudem kann es bei extremen Stresszuständen wie multimorbiden oder hochgradigen Angstzuständen zur Erschöpfung des sympathischen Nervensystems und folglich zum Ausbleiben nozifensiver Reaktionen kommen (WIESE, 2015).

Aus diesen Gründen sollte bei der Beurteilung von Reaktionen auf noxische Reize nicht nur ein isolierter Parameter herangezogen werden. Vielmehr sollte ein multiparametrischer Ansatz gewählt werden, da die Evaluation vieler Parameter in ihrer Gesamtheit die komplexen, multidimensionalen Antworten auf Schmerz am ehesten erfasst (SNEDDON et al., 2014).

1.4. Schmerz und Nozizeption bei Föten und Neonaten

Da Föten und Neonaten nicht verbal kommunizieren können, ist die Beurteilung ihres Schmerzempfindens eine Herausforderung (BELLIENI, 2019). Ob und zu welchem Zeitpunkt ihrer Entwicklung Föten die Fähigkeit zum Schmerzempfinden entwickeln, wird seit vielen Jahren erforscht und ist sowohl unter Wissenschaftlern als auch Ethikern ein viel diskutiertes Thema. In der Humanmedizin ist dies insbesondere im Zusammenhang mit rechtlichen Vorschriften zu Schwangerschaftsabbrüchen sowie chirurgischen Eingriffen bei Schwangeren und Föten relevant (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). In der Veterinärmedizin schließen Gesetze zum Tierschutz in vielen europäischen Ländern Säugetierembryonen ab der Hälfte ihrer normalen Entwicklungszeit mit ein (MELLOR & DIESCH, 2006). In der Literatur finden sich bis heute erheblich divergierende Aussagen (BELLIENI, 2019).

Um Schmerz wahrnehmen zu können, müssen bei Föten dieselben Voraussetzungen erfüllt sein wie bei adulten, schmerzkompetenten Individuen. Das Nervensystem muss ausgereift genug sein, um noxische Signale zu erkennen, weiterzuleiten und in Erfahrungen umzuwandeln, die als unangenehm wahrgenommen werden. Zudem muss das Gehirn dem Individuum die bewusste Wahrnehmung von Gefühlen ermöglichen. Ohne intaktes Bewusstsein kann ein Individuum weder Schmerzen noch Leiden wahrnehmen (MELLOR & DIESCH, 2006; MELLOR et al., 2007; BELLIENI, 2019). Es wird angenommen, dass sich die Fähigkeit zur Nozizeption und Schmerzperzeption während der pränatalen Zeit als progressiver adaptiver Prozess kontinuierlich entwickelt (BELLIENI, 2019). Evolutionär betrachtet macht dies Sinn, da der Fötus mit fortschreitendem Alter auf das Überleben außerhalb des Mutterleibs vorbereitet wird (BELLIENI, 2019).

Bis in die späten 1980er Jahre wurde angenommen, dass sogar Neugeborene aufgrund eines noch unreifen Nervensystems keine Schmerzen empfinden können. Daher wurden chirurgische Eingriffe hauptsächlich aus Sicherheitsbedenken ohne Analgesie durchgeführt (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Wissenschaftliche Studien zeigten dann jedoch, dass Anästhesie und Analgesie eine Stressreaktion verhindern und zu einem verbesserten postoperativen Ergebnis führen (ANAND et al., 1987). Seitdem werden chirurgische Eingriffe bei Neugeborenen unter Anästhesie und Analgesie durchgeführt (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Schmerz bei Frühgeborenen wird jedoch bis heute nicht ausreichend anerkannt und therapiert, weshalb viele Wissenschaftler weitere Forschung hinsichtlich Analgesie und Anästhesie bei Früh- und Neugeborenen fordern (THILL, 2023). Aufgrund ethischer Grundsätze ist die Forschung an humanen Föten und Neugeborenen allerdings eingeschränkt (THILL, 2023).

Lange Zeit wurde sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin angenommen, dass Föten keine Schmerzen empfinden können. Erst Studien ab 2001 zeigten, dass humane Föten auf noxische Stimuli mit Stressreaktionen reagieren, die durch Analgetika unterdrückt werden können (ANAND & MAZE, 2001; FISK et al., 2001). Wissenschaftler gingen dann davon aus, dass sich die Fähigkeit zur Schmerzperzeption im dritten Trimester (ab der 28. Gestationswoche) entwickelt, da ab diesem Zeitpunkt ein funktionaler Kortex vorhanden ist (LEE et al., 2005). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass eine fötale Schmerzperzeption möglicherweise bereits ab der 12. Gestationswoche in der kortikalen Subplatte und

subkortikalen Strukturen möglich ist (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020; PIERUCCI, 2020, 2021; THILL, 2022).

Es besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass die zur Schmerzperzeption notwendigen neuronalen Strukturen bei humanen Föten im letzten Trimester der Schwangerschaft ausgebildet sind (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Das nozizeptive Nervensystem ist ab der 20. – 22. Gestationswoche vollständig ausgebildet (BELLIENI, 2019) und der Kortex sowie thalamokortikale Verbindungen entwickeln sich in der 24. – 28. Gestationswoche (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020; THILL, 2023). Allerdings weist das nozizeptive Nervensystem beim Fötus einige Besonderheiten auf (THILL, 2023). Zum einen fehlt bei Föten die deszendierende Hemmung, wodurch sie sehr sensitiv auf noxische Stimuli reagieren (SEKULIC et al., 2016; GOKSAN et al., 2018). Zum anderen sind die rezeptiven Felder der Nozizeptoren groß, was zu einer schlechten Lokalisierbarkeit von Schmerz und einer niedrigen Schmerzschwelle führt (HATFIELD, 2014; JONES et al., 2022).

MELLOR et al. (2005) untersuchten Bewusstsein und Schmerzempfinden bei Schafföten und schlussfolgerten aus ihren Studien, dass der Fötus bis zur Geburt ununterbrochen in einem schlafähnlichen Zustand verbleibt und nicht durch externe Stimuli aufgeweckt werden kann, wodurch er nie bei Bewusstsein ist. Diese Schlussfolgerung stützten sie zum einen auf Beobachtungen im Elektroenzephalogramm (EEG). In den frühen Stadien der Embryonalentwicklung von Säugetieren ist keine EEG-Aktivität festzustellen. Mit fortschreitender Entwicklung zeigt das EEG sporadische Ausschläge, gefolgt von kurzen Perioden elektrischer Aktivität. Ab der Hälfte der Embryonalentwicklung ist eine rudimentäre, undifferenzierte schlafähnliche Hirnaktivität zu erkennen, die sich dann zu zwei differenzierten Mustern entwickelt, die dem postnatalen REM und nicht-REM Schlaf ähneln (HARDING et al., 1981; CLEWLOW et al., 1983; SZETO & HINMAN, 1985; BERGER et al., 1986; DAWES, 1988; MELLOR et al., 2007). Diese beiden schlafähnlichen Muster nehmen 95 % der späten Embryonalentwicklung ein, während Übergänge zwischen den beiden Stadien die restlichen 5 % ausmachen (MELLOR et al., 2005). Diese EEG-Aktivität ist gemäß MELLOR et al. (2007) nicht mit dem Bewusstsein kompatibel. Zum anderen zirkulieren im fötalen Blutkreislauf mehrere neuroinhibierende Substanzen, die von der Plazenta und dem fötalen Gehirn synthetisiert werden (Adenosin, Progesteron,

Allopregnenolon, Pregnenolon und Prostaglandin D2). Diese haben schlafinduzierende und sedative Effekte und unterdrücken die fötale Hirnaktivität (BELLIENI, 2019). MELLOR et al. (2005) nahmen an, dass diese neuroinhibierenden Substanzen den Fötus vollständig anästhesieren. Einige Wissenschaftler stützen sich auf die Forschung von MELLOR et al. (2005) und vertreten die Hypothese, dass humane Föten trotz funktionalen Nervensystems keine Schmerzen wahrnehmen können, da sie nicht bei Bewusstsein sind (RCOG, 2010). Jüngste Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass diese Hypothese nicht länger gültig ist (THILL, 2023). Einige Studien aus der Human- und Tiermedizin zeigen, dass die neuroinhibierenden Substanzen nur sedative Effekte haben und somit die Schmerzperzeption nicht ausschalten können (DUNWIDDIE & WORTH, 1982; POWELL et al., 1992). Eine Sedation konnte nur durch experimentelle Injektion von viel höheren Dosierungen als im fötalen Blut erreicht werden (BELLIENI, 2021). Darüber hinaus zeigen Studien, dass sowohl humane als auch Schafföten am Ende der Trächtigkeit Wachphasen aufweisen (BELLIENI, 2019). Ultraschalluntersuchungen belegen, dass humane Föten am Ende der Schwangerschaft etablierte Schlaf-Wach-Zyklen haben und zwischen der 30. und 40. Gestationswoche eine variable Zeit von 9 bis 20 % in einem aktiven Wachzustand verbringen (VAN DE PAS et al., 1994; GINGRAS et al., 2005; SUWANRATH & SUNTHARASAJ, 2010; KADIC & KURJAK, 2018). Ebenso wurde bei Schafföten anhand von Elektrokortikogramm, Elektromyogramm und Atmung festgestellt, dass sie sich ab dem 125. Gestationstag 5,6 % der Zeit in einem Wachzustand befinden (IOFFE et al., 1980). Zudem zeigen mehrere Studien, dass sowohl humane als auch Schafföten durch externe (auch noxische) Stimuli in einen bewussten Wachzustand aufgeweckt werden können (NIJHUIS et al., 1982; GOODLIN, 1983; SZETO & HINMAN, 1985; SZETO et al., 1988; SHINOZUKA et al., 1989; GINGRAS & O'DONNELL, 1998; SUWANRATH & SUNTHARASAJ, 2010; WALUSINSKI, 2010; DARNALL, 2013).

Darüber hinaus wurden bei humanen Frühgeborenen ab der 28. Gestationswoche Reaktionen auf noxische Reize wie Fersenpunktion oder Venenpunktion im EEG nachgewiesen (BARTOCCI et al., 2006; VANHATALO & KAILA, 2006; SLATER et al., 2010; THILL, 2023). Aufgrund der Unterschiede zwischen der intrauterinen und extrauterinen Umgebung sind Vergleiche zwischen Frühgeborenen und Föten jedoch nur begrenzt möglich (MELLOR et al., 2007;

THILL, 2023). Außerdem muss bei der Beurteilung des Bewusstseinszustandes von Föten berücksichtigt werden, dass sich das Bewusstsein stufenweise entwickelt (THILL, 2023). Das Basislevel des Bewusstseins umfasst die bewusste Wahrnehmung der Umgebung, die in subkortikalen Strukturen (Hirnstamm, Thalamus) und möglicherweise der kortikalen Subplatte stattfindet, und ist auf die Gegenwart fokussiert, ohne Erinnerungen und Selbstreflexion. Das nächste Level umfasst die bewusste Wahrnehmung des eigenen Körpers und schließlich das höhere innere Bewusstsein der eigenen Persönlichkeit, das im Kortex verarbeitet wird und zur Entscheidungsfindung führt (THILL, 2023). Das Basislevel des Bewusstseins ist durch Reaktionsfähigkeit auf die Umgebung gekennzeichnet, was sich in geplantem Verhalten, zielgerichteten Bewegungen und Lernverhalten manifestiert. Höheres Bewusstsein umfasst Erinnerungen, Selbstreflexion und die Vorstellung der Zukunft (THILL, 2023). Einige humanmedizinische Studien, die mit vierdimensionalem Ultraschall arbeiteten, zeigen, dass Indikatoren für das Basislevel des Bewusstseins bereits ab der 13. Gestationswoche vorhanden sind (THILL, 2023).

Die Ausbildung der thalamokortikalen Verbindungen in der 24. bis 28. Gestationswoche wurde von vielen Wissenschaftlern lange Zeit als essenziell für die bewusste Schmerzperzeption angesehen, wodurch ein Schmerzempfinden vor der 24. Gestationswoche als unwahrscheinlich galt (APKARIAN, 2018; NORTON et al., 2021; THILL, 2023). Humane Frühgeborene werden jedoch auch vor der 24. Gestationswoche in der klinischen Praxis als schmerzkompetent betrachtet und gemäß der American Academy of Pediatrics ist ein Schmerzmanagement mithilfe validierter Schmerzbeurteilungssysteme erforderlich (LIM & GODAMBE, 2016; THILL, 2023). Untersuchungen in einem multimodalen Ansatz zeigen, dass sowohl Frühgeborenen als auch Föten bereits vor der 24. Gestationswoche nach noxischen Stimuli Verhaltensveränderungen (Gesichtsausdrücke indikativ für Schmerzzustände, starke Körperbewegungen, intensive Atembewegungen), hämodynamische (Anstieg der HR) und hormonelle (Anstieg von Cortisol, β -Endorphin, NE) Stressreaktionen aufweisen, die durch Analgetika unterdrückt werden können. Bei Frühgeborenen werden diese Parameter als Indikatoren für Schmerzperzeption anerkannt, auch vor der Ausbildung thalamokortikaler Verbindungen. Beim Fötus werden diese jedoch oft nur als nozifensive Reaktionen betrachtet (THILL, 2023). Dies führt zu einer Diskrepanz in der Schmerzforschung

zwischen Frühgeborenen und Föten gleichen Alters (THILL, 2023). Folglich diskutieren Wissenschaftler zunehmend die Möglichkeit der fötalen Schmerzperzeption vor der Ausbildung thalamokortikaler Verbindungen in der 24. Gestationswoche (BRUSSEAU & MYERS, 2006; LOWERY et al., 2007; VAN SCHELTEMA et al., 2008; DEVOR et al., 2015).

Einige Wissenschaftler hinterfragen die Notwendigkeit eines funktionalen mit dem Rückenmark und der Peripherie verbundenen Kortex für die Schmerzperzeption (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Sie gehen davon aus, dass Verbindungen zwischen Rückenmark und Thalamus für gewisse Empfindungen oder zumindest für eine unterbewusste Schmerzerkennung ausreichen könnten (BELLIENI, 2019). Diese Hypothese stützt sich auf mehrere Studien aus der Humanmedizin, die untersucht haben, ob die Schmerzmatrix notwendig sowie ausreichend für die Schmerzwahrnehmung ist (SALOMONS & IANNETTI, 2022). Diese Studien zeigen, dass eine Aktivierung der Schmerzmatrixregionen nicht spezifisch für die Schmerzperzeption ist, sondern auch durch nicht-noxische visuelle und akustische Reize (IANNETTI & MOURAUX, 2010; MOURAUX et al., 2011) sowie bei Patienten mit kongenitaler Schmerzunempfindlichkeit erfolgt (SALOMONS et al., 2016). Dass die kortikalen Regionen der Schmerzmatrix nicht notwendig für die Schmerzperzeption sind, wurde in diesen Studien jedoch nicht gezeigt (IANNETTI & MOURAUX, 2010; MOURAUX et al., 2011; SALOMONS et al., 2016). Des Weiteren wurde bei Kindern mit Hydranenzephalie festgestellt, dass sie verschiedene Stimuli unterscheiden, visuelle Reize erkennen und Angst wahrnehmen können (SEWARDS & SEWARDS, 2000; PASLEY et al., 2004). FEINSTEIN et al. (2016) beobachteten bei einem Patienten mit hochgradigen bilateralen Läsionen kortikaler und subkortikaler Regionen der Schmerzmatrix intakte Schmerzantworten. Diese Studien legen folglich nahe, dass bestimmte kortikale Regionen wahrscheinlich nicht essenziell für die Schmerzperzeption sind (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). SALOMONS und IANNETTI (2022) halten diese Evidenz jedoch nicht für ausreichend, um den Konsens zu widerlegen, dass ein funktionaler Kortex für die bewusste Schmerzperzeption notwendig ist.

Einige humanmedizinische Schmerzforscher diskutieren zunehmend eine mögliche fötale Schmerzperzeption vor der 24. Gestationswoche in der kortikalen Subplatte (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Die kortikale Subplatte ist eine transiente fötale Struktur unterhalb der kortikalen Platte und enthält Neurone, die später in die

kortikale Platte migrieren (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020). Nozizeptive Nervenbahnen erreichen den Hirnstamm, den Thalamus und die kortikale Subplatte bereits in der 12. Gestationswoche (THILL, 2023). Funktionale Verbindungen zwischen der kortikalen Subplatte und dem Thalamus sind ebenso ab der 12. Gestationswoche vorhanden und gleichen den ab der 24. Gestationswoche vorhandenen thalamokortikalen Verbindungen (ULFIG et al., 2000; KOSTOVIĆ & JUDAS, 2010). Die kortikale Subplatte ist topographisch ähnlich wie die kortikale Platte organisiert (THILL, 2023) und kann thalamische Informationen verarbeiten sowie kortikale Schaltkreise beeinflussen (KANOLD & LUHMANN, 2010). Untersuchungen bei Frettchen zeigten, dass Reaktionen auf auditorische Stimuli als erstes aus Neuronen der Subplatte stammen (WESS et al., 2017). Die aktuelle Forschung indiziert, dass die sensormotorischen und somatosensorischen Regionen der kortikalen Subplatte aktiv und responsiv sind, jedoch fehlt bisher ein direkter Nachweis für die Beteiligung der kortikalen Subplatte an der Schmerzperzeption (THILL, 2023).

Die aktuelle neurowissenschaftliche Evidenz legt folglich nahe, dass die Möglichkeit zur Schmerzperzeption bei humanen Föten ab der 12. Gestationswoche nicht mehr ausgeschlossen werden kann (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020; THILL, 2023). Dennoch bleibt ein Paradoxon bei der Beurteilung von Reaktionen auf noxische Stimuli zwischen Frühgeborenen und Föten gleichen Alters bestehen (THILL, 2023). Einige Wissenschaftler betonen, dass die Schmerzperzeption des Fötus nicht mit der erlernten, selbstreflektierten sowie von biologischen, psychologischen und sozialen Faktoren beeinflussten Schmerzwahrnehmung eines adulten gesunden Menschen vergleichbar ist und somit nicht der Definition der IASP entspricht, auf die sich der Großteil der Schmerzforscher bezieht (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020; SALOMONS & IANNETTI, 2022). Allerdings wird von einigen Forschern angemerkt, dass eine solche differenzierte Definition die Fähigkeit zur Schmerzwahrnehmung fast ausschließlich auf vollentwickelte Menschen begrenzt (ANAND & CRAIG, 1996; DERBYSHIRE & RAJA, 2011), während Schmerz jedoch größere Dimensionen hat (BELLIENI, 2019). DERBYSHIRE und BOCKMANN (2020) sprechen deshalb in Bezug auf das fötale Schmerzempfinden von einem unmittelbaren und unreflektierten Schmerzgefühl ohne ein weiteres Verstehen oder Verarbeiten dieses Gefühls, welches möglicherweise außerhalb des Kortex stattfindet. Sie bezeichnen diese Art

von Schmerz als „core pain“. Sie halten es für möglich, dass Föten eine solche Art von Schmerz ab der 12. Gestationswoche wahrnehmen können. Inwiefern diese Art von Schmerz moralisch relevant ist, bleibt Teil ethischer Diskussionen (DERBYSHIRE & BOCKMANN, 2020).

Ein weiteres Argument für den Schutz von Föten ist die zunehmende Evidenz aus der Humanmedizin, dass noxische Stimuli beim Fötus die Schmerzwahrnehmung im späteren adulten Leben beeinflussen können (THILL, 2023). Auch falls der Fötus Schmerzen nicht bewusst wahrnehmen sollte, werden durch noxische Stimuli die zum Zeitpunkt der Entwicklung bereits ausgebildeten Nozizeptoren und Schmerzbahnen aktiviert (MELLOR et al., 2007). Mehrere Studien zeigen, dass das sich entwickelnde Nervensystem eine größere Empfindlichkeit gegenüber noxischen Stimuli aufweist. Noxische Stimuli beim Fötus führen zu einem erhöhten Risiko für Langzeitfolgen wie veränderte Schmerzsensitivität oder neurokognitive Beeinträchtigungen, die Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Lernstörungen sowie Verhaltensauffälligkeiten und motorische Probleme umfassen können (LIM & GODAMBE, 2016; GREEN et al., 2019; GURSUL et al., 2019; DUFF et al., 2020; CHATTERJEE et al., 2021).

Trotz dieser aktuellen wissenschaftlichen Evidenz aus der Humanmedizin beruft sich die American Veterinary Medical Association (AVMA) in ihren Leitlinien zur Euthanasie von Tieren noch auf die Arbeit von MELLOR (2010), die besagt, dass Säugetierföten während der Trächtigkeit und der Geburt nicht bei Bewusstsein sind (AVMA, 2020). Bei Vogelföten hingegen beschreibt die AVMA ohne Angabe einer Quelle, dass Bewusstsein und Schmerzempfinden ab 80 % der Inkubationszeit potenziell möglich sind, da eine anhaltende EEG-Aktivität mit zunehmender Amplitude vorhanden ist (AVMA, 2020).

1.5. Schmerz und Nozizeption beim Hühnerembryo – bisherige Datenlage

Nachdem selbst in der Humanmedizin divergierende Angaben in Bezug auf die Entwicklung der Schmerzperzeption bei Föten in der Literatur zu finden sind, ist dieses Thema auch bei Vogelembryonen schwierig zu adressieren. Das Schmerzempfinden von Vögeln und deren Embryonen ist im Allgemeinen rudimentär erforscht und schwierig zu beurteilen (SANN, 2004). Basierend auf der bisherigen Literatur zur Entwicklung des Hühnerembryos besteht unter

Wissenschaftlern ein allgemeiner Konsens, dass Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption und Schmerzperzeption bereits während ihrer Entwicklung im Ei erlangen, aber kein konkreter Zeitpunkt für das Einsetzen von Nozizeption und Schmerzempfinden genannt werden kann (ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015; BJØRNSTAD et al., 2015; KRAUTWALD-JUNGHANNS et al., 2018; REITHMAYER et al., 2021). Wissenschaftler sind sich nur einig, dass Nozizeption und Schmerzperzeption bis zum 7. Inkubationstag nicht möglich sind (ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015; BJØRNSTAD et al., 2015). Diese Aussage stützt sich hauptsächlich auf Publikationen von EIDE und GLOVER (1997), ROSENBRUCH (1997) und PETERS et al. (1956). EIDE und GLOVER (1995) untersuchten die Entwicklung von Nervenzellfortsätzen mittels spezifischer Färbetechnik. Demnach erreichen die ersten afferenten Nervenfasern das Neuralrohr bereits an Inkubationstag 4, jedoch ist die synaptische Verbindung zum Dorsalhorn vor dem 7. Inkubationstag nicht vorhanden, sodass ein noxischer Reiz bis zu diesem Zeitpunkt nicht weitergeleitet werden kann (EIDE & GLOVER, 1995, 1997). Erst am 11. – 14. Inkubationstag innervieren die afferenten Nervenfasern sowohl ihre peripheren als auch zentralen Ziele (EIDE & GLOVER, 1995). Auch ROSENBRUCH (1997) stellt klar, dass sich die neuronalen Voraussetzungen für Nozizeption und Schmerzempfinden erst nach dem 7. Inkubationstag entwickeln. Er beschreibt außerdem, dass die Entwicklung des nozizeptiven Nervensystems bis zum 11. Inkubationstag andauert (ROSENBRUCH, 1997). Zudem hat PETERS et al. (1956) gezeigt, dass bis Inkubationstag 6,5 keine elektrische Hirnaktivität im EEG ableitbar ist, womit die Perzeption von Schmerzen ausgeschlossen ist. Weiterführend hat PETERS et al. (1965) mittels bipolarer elektrischer Ableitungen von den Hirnlappen von Hühnerembryonen den Beginn spontaner elektrischer Hirnaktivität ab dem 11. Bis 13. Inkubationstag festgestellt. MELLOR und DIESCH (2007) konnten ebenso bis zum 13. Inkubationstag keine elektrische Hirnaktivität feststellen. Erst danach konnten sie zeigen, dass Bewegungen des Embryos von spinalen und subkortikalen neuronalen Strukturen gesteuert werden und ab 80 % der Inkubationszeit eine kontinuierliche undifferenzierte EEG-Aktivität abzuleiten ist, die dann zu schlafähnlichen Mustern ausreift (MELLOR & DIESCH, 2007). Weitere Publikationen weisen darauf hin, dass sich das Neuralrohr bis zum 13. Inkubationstag zu einem funktionalen Gehirn entwickelt, sodass die Verarbeitung von (noxischen) Stimuli im Gehirn ab diesem Zeitpunkt potenziell möglich ist

(BALABAN et al., 2012; ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015; BJØRNSTAD et al., 2015; AVMA, 2020; ACUC, 2024; REITHMAYER et al., 2021).

Ob und in welchem Ausmaß der Hühnerembryo zwischen dem 7. und 13. Inkubationstag zur Wahrnehmung von Empfindungen fähig ist, ist unklar (REITHMAYER et al., 2021). Ab dem 10. Inkubationstag sind beim Hühnerembryo Opioidrezeptoren in Hirnregionen, die als Schlüsselrolle bei der Verarbeitung sensorischer Reize angesehen werden, in vivo nachweisbar (HENDRICKSON & LIN, 1980). Ab diesem Zeitpunkt wurden auch elektrische Ableitungen aufgezeichnet, die auf eine zunehmende Muskelaktivität mit Bewegungen von Kopf und Augen hindeuten (PETERS et al., 1956). Hinweise auf die Entwicklung des ZNS gibt auch die neuronale Aktivität nach sensorischen Reizen. Die Erkennung von taktilen Reizen ist ab dem 6. Inkubationstag als möglich beschrieben, die Erkennung von propriozeptiven vestibulären Reizen (Lageveränderungen) ab dem 8. bis 10. Inkubationstag, von Geschmacksreizen ab dem 12. Inkubationstag, von akustischen Reizen ab dem 12. bis 14. Inkubationstag, von visuellen Reizen ab dem 18. Inkubationstag und von Geruchsreizen ab dem 20. Inkubationstag (TONG et al., 2013).

Das Vorhandensein eines funktionalen Gehirns ab Inkubationstag 13 lässt jedoch nicht direkt das Vorhandensein einer bewussten Wahrnehmung von Empfindungen schlussfolgern. Über das Einsetzen des Bewusstseins bestehen unterschiedliche Hypothesen unter Wissenschaftlern. MELLOR und DIESCH (2007) gehen davon aus, dass der Hühnerembryo bis mindestens Inkubationstag 17 in einem schlafähnlichen Zustand bleibt, der nicht mit dem Bewusstsein vereinbar ist, wodurch Schmerzen nicht wahrgenommen werden können. Amerikanischen Richtlinien zur Euthanasie von Tieren ist wiederum zu entnehmen, dass bei Vogelembryonen ab 50 – 80 % der Inkubationszeit bereits die Möglichkeit von Bewusstseinsphasen besteht (AVMA, 2020; ACUC, 2024). Des Weiteren kann ein Zeitpunkt für das Einsetzen des Schmerzempfindens auch aufgrund der fehlenden Kenntnis über die Entwicklung des Tractus spinothalamicus, welcher beim Vogel die wichtigste Bahn zur Weiterleitung nozizeptiver Signale vom Rückenmark zum Gehirn ist, nicht genannt werden (BJØRNSTAD et al., 2015).

Bei der Beschreibung der Entwicklung der Nozizeption von Hühnerembryonen berufen sich Wissenschaftler häufig auf eine russische Publikation, in der reflektorische Reaktionen von Hühnerembryonen auf verschiedene (noxische)

Reize untersucht wurden (CHUMAK, 1961). CHUMAK (1961) konnte erste reflektorische Reaktionen in Form von dorsal und lateral gerichteten Kopfbewegungen nach mechanischen und thermischen noxischen Reizen sowie Nadelstichen im Schnabelbereich am 7. Inkubationstag beobachten. Bis zum 8. Inkubationstag kommt es zu einer Ausweitung der sensiblen Körperregionen, so dass Reaktionen auf externe Reize auch im Bereich des Halses, des Unterarms und des Carpometacarpus festzustellen sind. Gemäß CHUMAK (1961) sind diese reflektorischen Bewegungen von der spontanen motorischen Aktivität des Embryos, die sich als simultane Bewegungen von Kopf, Rumpf und Gliedmaßen darstellt, abgrenzbar. Eine externe Stimulation der Vordergliedmaßen führt beispielsweise zu separaten Flügelbewegungen. Ab dem 9. bis 10. Inkubationstag werden auch Geschmacksrezeptoren von externen Reizen wie Salzsäure- oder Schwefelsäurechininlösung angesprochen und rufen eine Öffnung des Schnabels hervor. Ab dem 14. bis 15. Inkubationstag nehmen die reflektorischen Reaktionen nach mechanischen, thermischen und chemischen noxischen Stimuli einen spezifischeren Charakter an. Es treten rhythmische koordinierte Bewegungen und deutlicher ausgeprägte Abwehrbewegungen wie Schütteln oder Kratzen auf. Diese Entwicklung der Bewegungsmuster spricht für eine zunehmende Ausreifung und Beteiligung höherer Abschnitte des ZNS. Ab dem 16. bis 17. Inkubationstag konnten reflektorische Reaktionen des Bewegungsapparats nach Geruchsreizen beobachtet werden. Des Weiteren treten erste Bewegungsreaktionen auf vestibuläre und visuelle Reize ab dem 17. bis 18. Inkubationstag auf. Am 20. Inkubationstag sind dann auch Reaktionen auf akustische Reize festzustellen (CHUMAK, 1961).

Weitere Hinweise auf Nozizeption beim Hühnerembryo liefern Untersuchungen über die Entwicklung des nozizeptiven Nervensystems. (Nozizeptive) sensorische Neurone stammen wie viele andere Zelltypen (z. B. Gliazellen, Melanozyten) von Neuralleistenzellen ab. Neuralleistenzellen entwickeln sich aus dem dorsalen Teil des Neuralrohrs und migrieren über die dorsale Mittellinie zum kontralateralen Spinalganglion bevor sie sich zu verschiedenen Zelltypen differenzieren. Bereits vor der Migration wird durch bestimmte Gene festgelegt, zu welchem Zelltyp sich eine Neuralleistenzelle differenziert. Die Migration und Differenzierung findet sehr früh in der Embryonalentwicklung statt, beim Hühnerembryo ist die Migration bis zum 2. – 3. Inkubationstag abgeschlossen und die Differenzierung in verschiedene Zelltypen, einschließlich nozizeptiver Neurone, beginnt (GEORGE et al., 2007).

Bei der Differenzierung von (nozizeptiven) Neuronen spielt der Nervenwachstumsfaktor (NGF) eine wichtige Rolle. Beim Hühnerembryo ist bereits ab dem 4. Inkubationstag eine ausgeprägte Expression des NGF-Rezeptors festzustellen (RAIVICH et al., 1985). KOLTZENBURG und LEWIN (1997) untersuchten außerdem die funktionalen Eigenschaften von sensorischen Neuronen der Haut bei Hühnerembryonen ab dem 17. Inkubationstag und Küken bis zu einem Alter von drei Wochen. Vier Tage vor dem Schlupf wurde als erstes eine Aktivität der Afferenzen gemessen. Das Verhältnis von A- und C-Fasern ist am 17. bis 21. Inkubationstag dem der Küken sehr ähnlich. Einige afferente Fasern können außerdem als Nozizeptoren identifiziert werden, da sie auf noxische thermische und mechanische Reize sowie Entzündungsmediatoren reagieren. Die physiologischen Eigenschaften der sensorischen Afferenzen sind während der Embryonalentwicklung jedoch noch nicht vollständig ausgereift und es kommt nach dem Schlupf noch zu Veränderungen der Reaktionseigenschaften. Die mechanische Schwelle nimmt mit voranschreitendem Alter der Küken zu. Zudem kommt es nach dem Schlupf zu einer stärkeren Reaktion auf noxische überschwellige Hitzereize, was darauf hindeutet, dass die Hitzesensitivität von Neuronen mit zunehmendem Alter reift. Außerdem ist eine große Population hitzesensitiver Neurone bei Embryonen bei geschlüpften Küken nicht mehr vorhanden. Es wird angenommen, dass eine Subpopulation myelinisierter Afferenzen die Fähigkeit, auf Hitze zu reagieren nach dem Schlupf verliert. Des Weiteren schreitet die Myelinisierung von Axonen im Gegensatz zu Säugetieren bei Vögeln bis zum Erwachsenenalter fort (KOLTZENBURG & LEWIN, 1997).

Folglich ist gemäß der bisherigen Literatur nur wissenschaftlich akzeptiert, dass Hühnerembryonen bis zum 7. Inkubationstag nicht zur Nozizeption und Schmerzperzeption fähig sind, darüber hinaus aber kein konkreter Zeitpunkt für deren Auftreten genannt werden kann (BJØRNSTAD et al., 2015). Erste reflektorische Bewegungsreaktionen auf externe Reize, wie mechanische und thermische Stimulation, die auf nozizeptive Reaktionen hinweisen könnten, sind nach dem Schluss von multisynaptischen Reflexbögen ab dem 7. Inkubationstag festzustellen. Spezifischere koordinierte Reaktionen treten allerdings erst ab dem 14. bis 15. Inkubationstag auf (CHUMAK, 1961). Hinweise auf eine mögliche Fähigkeit zur zentralen Verarbeitung von Reizen sind mit der Entwicklung eines funktionalen Gehirns ab dem 13. Inkubationstag gegeben (BJØRNSTAD et al.,

2015).

2. Kardiovaskuläre Parameter

2.1. Embryonalentwicklung des kardiovaskulären Systems

Die Entwicklung der Organe beginnt früh in der Embryonalentwicklung des Huhns und bis zum Schlupf sind alle Organe funktional. Am Anfang schreitet die Entwicklung sehr schnell voran. Bereits 30 bis 44 Stunden nach Inkubationsbeginn ist ein Herzschlag vorhanden und die Zirkulation von Blut beginnt (PATTEN, 1952; TONG et al., 2013). Ab Inkubationstag 2 ist eine Pulsation der Dotterarterie festzustellen (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967). In dieser frühen Zeit der Embryonalentwicklung ist die Blutzirkulation jedoch noch nicht notwendig für den Transport von respiratorischen Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten zu und von den Geweben. Aufgrund der sehr geringen Größe des Embryos wird dieser Transport allein durch Diffusion erreicht (BURGGREN, 2013). Es wird daher angenommen, dass das frühe Einsetzen eines Herzschlags und einer Blutzirkulation eine entscheidende Rolle bei der peripheren Angiogenese spielt (BURGGREN et al., 2000; BURGGREN et al., 2004; BRANUM et al., 2013; BURGGREN, 2013).

Das Herz des Hühnerembryos stellt zu Beginn eine paarige tubuläre Struktur dar, die sich dann zu einer einzelnen tubulären Struktur entwickelt. Das tubuläre Herz wächst zunächst schneller als das Perikard, weshalb es sich krümmt. Durch den Einstrom von Blutgefäßen in die tubuläre Struktur wird die innere Struktur des Herzens geformt (MUELLER et al., 2015). Somit entsteht die vier Kammern Struktur des Herzens bis zum 8. oder 9. Inkubationstag (PATTEN, 1952). Ab dem 7. Inkubationstag ist das Herz vollständig in der Brusthöhle eingebettet (TONG et al., 2013). Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt die Masse des Herzens, wobei das Wachstum des Herzens in Relation zum Körper des Embryos zu Beginn der Embryonalentwicklung am größten ist. Das Verhältnis der Herzmasse zur Gesamtkörpermasse beträgt am 4. Inkubationstag 1,8 % und am 18. Inkubationstag 0,17 % (MUELLER et al., 2015). Auch das Blutvolumen steigt mit zunehmender Inkubationszeit, wobei dies nicht so schnell geschieht wie das Wachstum des Herzens. Daher nimmt das gewichtsspezifische Blutvolumen mit voranschreitender Inkubation ab. Dieses beträgt am 4. Inkubationstag 1 ml/g und am 18. Inkubationstag 0,15 ml/g (MUELLER et al., 2015). Mit dem Anstieg von Herzmasse und Blutvolumen nimmt auch das Herzschlagvolumen zu (MUELLER et al., 2015). Mittels Blutgasanalyse oder Durchflusssonde wurde festgestellt, dass der Blutfluss durch die Chorioallantoismembran (CAM) mit dem Wachstum des

Embryos zunimmt (MUELLER et al., 2015). Der Anteil des Herzschlagvolumens, der in die CAM fließt, nimmt jedoch mit zunehmendem Wachstum des Embryos ab. Während an Inkubationstag 10 bis 13 noch die Hälfte der Herzauswurfleistung in die CAM fließt, sind es an Tag 17 bis 19 nur ca. 40 % (MULDER et al., 1997; DZIALOWSKI et al., 2011). Nach TAZAWA und JOHANSEN (1987) sind es an Tag 16 bis 18 sogar nur noch 17 bis 20 %. Folglich nimmt der Anteil der Herzauswurfleistung, der in Organen und Geweben, insbesondere Herz und Gehirn fließt, mit voranschreitender Entwicklung zu (MULDER et al., 1997).

2.2. Blutdruck von Hühnerembryonen

2.2.1. Entwicklung des Blutdrucks beim Hühnerembryo

Der Blutdruck von aviären Embryonen wird hauptsächlich durch das sympathische Nervensystem reguliert (ALTIMIRAS et al., 2009). Ab 30 % der Inkubationszeit ist ein positiver β -adrenerger chronotroper Einfluss auf arteriellen Blutdruck und HR vorhanden (ST PETERY & VAN MIEROP, 1974). Dieser ist entscheidend für die kardiovaskuläre Basalfunktion (TAZAWA et al., 1992; CROSSLEY & ALTIMIRAS, 2000). Ab 60 % der Inkubationszeit ist sowohl ein α - als auch β -adrenerger Einfluss auf das Gefäßsystem festzustellen, der durch zirkulierende Katecholamine verursacht wird (GIRARD, 1973; ST PETERY & VAN MIEROP, 1974; TAZAWA et al., 1992; CROSSLEY & ALTIMIRAS, 2000). Parallel zur maximalen Katecholaminplasmakonzentration am 19. Inkubationstag erreicht auch der α - und β -adrenerge Tonus seinen Höhepunkt kurz vor dem inneren Schalendurchbruch nach 90 % der Inkubationszeit (CROSSLEY & ALTIMIRAS, 2000).

VAN MIEROP und BERTUCH (1967) zeichnete als erstes Blutdruckwerte von Hühnerembryonen von Inkubationstag 1,9 bis 22 auf. GIRARD (1973) zeichnete dann Blutdruckwerte bis drei Monate nach dem Schlupf auf (Tabelle 2). Der systolische (SAP), diastolische (DAP) und mittlere arterielle Blutdruck (MAP) von Hühnerembryonen steigt vom 3. bis 10. Inkubationstag exponentiell an. An Inkubationstag 3 beträgt der MAP gemäß GIRARD (1973) $0,52 \text{ mmHg} \pm 0,06$. Ab dem 10. Inkubationstag bis zum Schlupf ist die Anstiegsrate des Blutdrucks geringer. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Eischale das Volumen des Eis und damit auch das Wachstum der Chorioallantois, die bis Inkubationstag 15 wächst und sich anschließend bis zum Schlupf zurückbildet,

limitiert (GIRARD, 1973). An Inkubationstag 20 erreicht der MAP schließlich einen Wert von $24,5 \text{ mmHg} \pm 1,5$ (GIRARD, 1973). Nach dem Schalendurchbruch kommt es zu einem akuten Abfall des Blutdrucks in den Chorioallantoisarterien, da die Atmung einsetzt und die CAM nicht mehr für den Gasaustausch nötig ist (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967). Nach dem Schlupf steigt der MAP gemessen in der Arteria carotis exponentiell an, sodass er nach ein bis zwei Tagen einen Wert von $48,4 \text{ mmHg} \pm 10,5$ und nach sechs Wochen einen Wert von $113,1 \text{ mmHg} \pm 11,0$ erreicht, was dem MAP eines adulten Huhns entspricht (GIRARD, 1973).

Tabelle 2: mittlerer SAP, DAP und MAP von Hühnerembryonen von Inkubationstag 2 bis 21 (modifiziert nach VAN MIEROP & BERTUCH (1967) und GIRARD (1973)).

Inkubationstag	Blutdruck nach VAN MIEROP & BERTUCH (1967) (mmHg)		Blutdruck nach GIRARD (1973) (mmHg)		
	<i>SAP</i>	<i>DAP</i>	<i>SAP</i>	<i>DAP</i>	<i>MAP</i>
2	0,53	0,37			
3	1,25	0,81	0,61	0,43	0,52
4	1,35	0,80			
5	1,90	1,10	1,19	0,83	1,01
6	3,32	1,75	1,68	0,98	1,33
7	4,19	2,16	2,66	1,24	1,95
8	5,45	2,90	3,59	1,40	2,49
9	7,12	3,53	4,73	1,94	3,33
10	9,20	4,00	7,43	2,76	5,09
11	12,40	5,60	7,88	2,91	5,39
12	15,00	7,20	10,60	4,10	7,30
13	17,70	7,90	11,10	4,30	7,70
14	21,20	10,00	11,30	4,60	7,90
15	24,30	12,00	13,50	5,90	9,70
16	26,80	13,40	18,90	9,40	11,40
17	30,00	17,00	21,40	11,70	16,50
18	32,00	18,00	26,50	16,00	21,20
19	36,00	21,50	27,80	16,50	22,10
20			29,90	19,10	24,50
21	56,00	38,00			

Neben den Katecholaminen nehmen auch andere Hormone Einfluss auf den Blutdruck. Angiotensin II wurde intensiv bei Hühnerembryonen untersucht. Es ist Bestandteil des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und ein starker Vasokonstriktor (MUELLER et al., 2015). Die Komponenten des RAS (Renin, Angiotensin II, Angiotensin II Rezeptor, Angiotensin-converting Enzym) sind in der frühen Embryonalentwicklung bereits vorhanden (NISHIMURA et al., 2003; SAVARY et al., 2005; CROSSLEY et al., 2010). Die Plasmakonzentration von Angiotensin II

ist beim Embryo höher als bei adulten Tieren. Ab 60 % der Inkubationszeit wird durch Angiotensin II ein Anstieg des MAP verursacht, wobei die mittlere HR nicht beeinflusst wird, da Angiotensin II den kardialen Baroreflex unterdrückt (CROSSLEY et al., 2010). Der Baroreflex ist ein wichtiger Kompensationsmechanismus, indem kurzfristige Änderungen des MAP ausgeglichen werden, und ist ab 80 % der Inkubationszeit funktional (ALTIMIRAS & CROSSLEY, 2000; ELFWING et al., 2011). Beispielsweise löst der Baroreflex bei einem Anstieg des Blutdrucks einen rapiden Abfall der HR aus (DZIALOWSKI & CROSSLEY, 2022). Angiotensin II setzt ab 90 % der Inkubationszeit die Sensitivität des Baroreflexes herab (MUELLER et al., 2015).

Des Weiteren nehmen Endothelin-1 und natriuretische Peptide Einfluss auf das kardiovaskuläre System (MUELLER et al., 2015). Endothelin-1 ist ein potenter Vasokonstriktor. Es wird vor allem im Endothel gebildet und ist ab 15 % der Inkubationszeit bei Hühnerembryonen festzustellen (HALL et al., 2004; GROENENDIJK et al., 2007). Außerdem sind ab Inkubationstag 14 natriuretische Peptide vorhanden, die von Herzmuskelzellen gebildet werden und vasodilatierend wirken (MAKSIMOV & KOROSTYSHEVSKAYA, 2013).

Weitere bedeutende Einflussfaktoren auf den Blutdruck stellen die Eitemperatur und das respiratorische Milieu dar. Veränderungen der Eitemperatur beeinflussen den MAP stark. An Inkubationstag 3 steigen Blutdruck und HR mit zunehmender Temperatur an, wobei bei 40 – 42 °C ein Limit erreicht ist und es wieder zum Abfall kommt. An Inkubationstag 7 hingegen steigt der Blutdruck bis zu einem Maximum bei 30 – 35 °C an und fällt dann mit zunehmender Temperatur ab, sodass bei 37 – 38 °C der Minimalwert erreicht wird (GIRARD, 1973). Hypothermie wird von Hühnerembryonen besser toleriert als Hyperthermie. Insbesondere Embryonen an Inkubationstag 3 sind sehr resistent gegenüber Hypothermie. An Inkubationstag 7 ist bei Hypothermie zu einem gewissen Grad eine Kompensation zu beobachten, so dass die verringerte HR durch eine Erhöhung des Blutdrucks kompensiert wird (GIRARD, 1973). TAZAWA et al. (1985) konnte an Inkubationstag 15 bis 17 keine Veränderung oder nur einen leichten Abfall des Blutdrucks bei einer Hypothermie von 26 °C feststellen. Des Weiteren wird durch Hypoxie ein Abfall des Blutdrucks verursacht, wohingegen Hyperoxie einen Anstieg des Blutdrucks verursacht. Ebenso kommt es durch Hyperkapnie zu einem Abfall des Blutdrucks. Gleiches tritt beim Zusammenwirken von Hyperkapnie und Hypoxie auf. Hyperkapnie führt

zusammen mit Hyperoxie hingegen zu einem Anstieg des Blutdrucks (GIRARD, 1973).

2.2.2. Messung des Blutdrucks beim Hühnerembryo

Die Messung des Blutdrucks bei aviären Embryonen erfolgt durch eine direkte intraarterielle Messung *in ovo*. Aufgrund der hohen Invasivität ist keine Langzeitmessung möglich. Für die Katheterisierung der Arterie können sehr feine Glaskapillaren oder Kanülen verwendet werden, deren Durchmesser etwas geringer ist als der der Arterie (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967; GIRARD, 1973; TAZAWA, 1981). VAN MIEROP und BERTUCH (1967) haben als erstes Werte von SAP und DAP von Hühnerembryonen über den gesamten Zeitraum ihrer Entwicklung erfasst. Sie konnten bereits 46 Stunden nach Inkubationsbeginn einen pulsatilen arteriellen Blutdruck messen, indem sie zusätzlich zum Druckaufnehmer Verstärker einsetzten (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967). Der Katheter sollte bei Embryonen ab dem 5. Inkubationstag durch Ligaturen gesichert werden, um Blutungen zu vermeiden. Bei sehr jungen Embryonen ist dies nicht nötig, da die Gefäße sehr klein sind. Bei Embryonen ab dem 7. Inkubationstag ist eine Heparinisierung sinnvoll, um Blutkoagel zu vermeiden (GIRARD, 1973).

Bei Embryonen bis zum 5. Inkubationstag eignet sich ein Ast der Dotterarterie am besten zur Katheterisierung, wofür das Ei eröffnet werden muss. Ab dem 6. Inkubationstag kann ein Ast der Chorioallantoisarterie verwendet werden (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967; GIRARD, 1973). Die Chorioallantois ist der gut durchblutete äußere Teil der Allantois, der für den Gasaustausch zuständig ist und von den Chorioallantoisarterien gespeist wird. Der durch den Nabelstrang ziehende Gefäßstamm teilt sich in eine rechte und linke Chorioallantoisarterie auf (TAZAWA et al., 1985). Bei älteren Embryonen kann die Katheterisierung durch ein kleines Loch in der Schale (1 cm²) vorgenommen werden (TAZAWA, 1981).

TAZAWA (1981) konnte durch die Bestimmung der Blutgaskonzentrationen (O₂ und CO₂), des pH-Werts und der Bikarbonatkonzentration nachweisen, dass es bei Embryonen am 16. Inkubationstag durch die Katheterisierung der Chorioallantoisarterie nicht zu einer Beeinflussung des Gasaustausches und der Blutzirkulation kommt. VAN MIEROP und BERTUCH (1967) haben bei Embryonen ab Inkubationstag 5,5 auch versucht, den ventrikulären Druck mit einer Kapillare im Herz zu messen, wobei es häufig zu Komplikationen wie dem

Anhaften der Kapillare an der Herzwand kam. Die gelungenen Messungen ähnelten denen von adulten Tieren und zeigten einen hohen diastolischen Ventrikeldruck, was darauf hinweist, dass bereits früh in der Entwicklung Gefäßklappen funktional sind (VAN MIEROP & BERTUCH, 1967). TAZAWA (1981) zeichnete zum ersten Mal auch den venösen Druck bei Embryonen am 14. bis 16. Inkubationstag auf. Der Druck in der Allantoisvene war pulsatil und veränderte sich vom 14. bis 16. Inkubationstag nicht; er betrug zwischen 2,5 und 4,8 cmH₂O (TAZAWA, 1981).

2.3. Herzfrequenz von Hühnerembryonen

2.3.1. Entwicklung der Herzfrequenz beim Hühnerembryo

Nachdem das Herz beginnt zu schlagen, steigt die mittlere HR von Hühnerembryonen von 150 bpm an Inkubationstag 4 auf 222 bpm an Inkubationstag 10 an (MUELLER et al., 2015; PHUPHANIN et al., 2019). Anschließend erreicht die mittlere HR ein Plateau zwischen 206 – 231 bpm (PHUPHANIN et al., 2019). Nach 60 – 70 % der Inkubationszeit kommt es zu einem temporären Anstieg der mittleren HR. Vor dem inneren Schalendurchbruch fällt die mittlere HR auf 180 bpm ab und steigt während dem Schlupf wieder an (TAZAWA et al., 1991; PHUPHANIN et al., 2019). Während bei nestflüchtenden Spezies entweder ein Plateau oder ein Abfall der mittleren HR vor dem Schlupf festzustellen ist, kommt es bei nesthockenden Spezies zu einem Anstieg der mittleren HR vor dem Schlupf (TAZAWA et al., 1991; TAZAWA et al., 1994). Eine Gegenüberstellung von Messwerten der HR von GIRARD (1973) und PHUPHANIN et al. (2019) findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: mittlere Herzfrequenz von Hühnerembryonen von Inkubationstag 3 bis 20 (modifiziert nach GIRARD (1973) und PHUPHANIN et al. (2019)).

Inkubationstag	HR nach GIRARD (1973) (bpm)	HR nach PHUPHANIN et al. (2019) (bpm)
3	138	
4		150
5	191	168
6	200	187
7	222	208
8	213	214
9	212	221
10	233	222
11	224	216
12	207	206
13	213	215
14	200	219
15	218	231
16	211	211
17	216	216
18	207	210
19	211	219
20	221	180

Untersuchungen bei Tauben und Uferschwalben haben ergeben, dass Embryonen aus dem gleichen Gelege ähnliche Entwicklungsmuster der mittleren HR aufweisen (BURGGREN et al., 1994). Ob dieser sog. Geschwistereffekt genetisch bedingt ist oder epigenetische Faktoren enthält wurde bisher nicht bestätigt (MUELLER et al., 2015). Konsens besteht, dass physiologische Prozesse durch epigenetische Mechanismen über mehrere Generationen hinweg übertragen werden können (HO & BURGGREN, 2010, 2012). Es wird zudem angenommen, dass Einflüsse von Umweltfaktoren auf das Muttertier zur Folge haben, dass Geschwister ähnliche Muster in der physiologischen Entwicklung aufweisen, eventuell sogar durch direkte Beeinflussung der Gameten des Muttertiers (BURGGREN et al., 1994; DZIALOWSKI & SOTHERLAND, 2004; HO et al., 2011).

Neben entwicklungsbedingten Veränderungen der mittleren HR existieren auch Veränderungen der HR zwischen einzelnen Schlägen. Diese wird als momentane HR bezeichnet (MUELLER et al., 2015). Bis zum 11. Inkubationstag ist die momentane HR in Ruhe sehr konstant, da in diesem frühen Entwicklungsstadium noch kein adrenerger und cholinerges Einfluss auf das kardiovaskuläre System besteht. Ab Inkubationstag 12 bis 13 treten Fluktuationen der momentanen HR auf, die sich als temporäre schnelle Dezelerationen darstellen und zunehmend häufiger

werden (HÖCHEL et al., 1998; CHIBA et al., 2004). Anschließend treten vermehrt Arrhythmien auf. An Inkubationstag 15 bis 16 sind vor allem temporäre Akzelerationen festzustellen, gefolgt von zunehmend stärkeren Dezelerationen und Akzelerationen bis zum Schlupf (HÖCHEL et al., 1998; TAZAWA et al., 1999; MORIYA et al., 2000; TAZAWA et al., 2002; KHANDOKER et al., 2003). Untersuchungen an Hühnerembryonen zeigen, dass Dezelerationen der momentanen HR durch Gabe von Atropin verschwinden und die Baseline-HR ansteigt (CHIBA et al., 2004). Es lässt sich also schlussfolgern, dass diese Dezelerationen durch vagalen Einfluss ausgelöst werden (MUELLER et al., 2015). Ab Inkubationstag 12 bis 13 setzt der vagale Tonus ein und reift mit der Embryonalentwicklung aus. Auch cholinergere Einfluss konnte ab diesem Zeitpunkt festgestellt werden (YONETA et al., 2006). Während dem inneren Schalendurchbruch treten zum ersten Mal infradiane Rhythmen auf und während dem externen Schalendurchbruch ist eine respiratorische Arrhythmie festzustellen. Nach dem Schlupf tritt dann zum ersten Mal ein circadianer Rhythmus der HR auf. Fluktuationen der momentanen HR treten auch nach dem Schlupf auf (TAZAWA et al., 1999; MORIYA et al., 2000; TAZAWA et al., 2002).

2.3.2. Messung der Herzfrequenz beim Hühnerembryo

Für die Messung der HR bei aviären Embryonen wurden verschiedene invasive, semi-invasive und nicht invasive Techniken etabliert (PHUPHANIN et al., 2019). Invasive Techniken beinhalten die Katheterisierung einer Arterie. Aufgrund der hohen Invasivität werden diese Techniken vor allem angewendet, wenn gleichzeitig die Messung des Blutdrucks erforderlich ist, und eignen sich nicht für eine Langzeit-Messung (TAZAWA, 1981; PHUPHANIN et al., 2019).

Das Elektrokardiogramm (EKG) ist eine semi-invasive Technik und wird aufgrund der hohen Verfügbarkeit des technischen Equipments als Methode der Wahl bei Hühnerembryonen benutzt. Hierfür werden Metallelektroden durch kleine Löcher in der Eischale 3 – 4 mm tief in die Eiflüssigkeit eingetaucht (TAZAWA et al., 1989; MORIYA et al., 1999; AUBERT et al., 2000; AUBERT et al., 2004; HABERMANN et al., 2008). Auch eine Langzeit-EKG-Messung ist möglich, wobei hierfür die Elektroden vorsichtig zwischen der Eischale und der äußeren Schalenhaut positioniert werden (PIROW et al., 1995). In der zweiten Hälfte der Inkubationszeit kann die HR außerdem mittels Pulsoxymetrie bestimmt werden. Hierfür muss die Eischale in einem Durchmesser von 1 mm entfernt werden, wobei

die Schalenhaut intakt bleibt (LEWIN et al., 1997).

Nicht invasive Methoden zur Messung der HR bei aviären Embryonen basieren auf den Prinzipien der Ballistokardiographie (BCG), der Akustokardiographie (ACG) und der Lichtabsorption (PHUPHANIN et al., 2019). Bei der BCG wird mit Hilfe eines Laserabstandssensors oder einer Tonbandkassette die Bewegung der Eischale, die durch die Kontraktion des Herzens verursacht wird, gemessen (SUZUKI et al., 1989; TAZAWA et al., 1989; HASHIMOTO et al., 1991; TAZAWA et al., 1999; TAZAWA, 2005). Die Bewegung des Eis durch den Herzschlag beträgt ungefähr 1 μm (SAKAMOTO et al., 1995). Bei der ACG werden mit Hilfe eines Mikrophons oder eines Differenzdrucksensors die akustischen Druckunterschiede, die außerhalb der Eischale durch den Herzschlag des Embryos entstehen, gemessen (RAHN et al., 1990; AKIYAMA et al., 1997). Diese beiden Methoden können in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit verwendet werden. Um Artefakte zu vermeiden, ist eine effektive Rauschunterdrückungsmethode erforderlich. Außerdem ist das technische Equipment für diese beiden Methoden sehr teuer (PHUPHANIN et al., 2019). Forscher greifen inzwischen immer häufiger auf optische sog. photoplethysmographische Messmethoden (PPG) zurück, da diese einfach und zuverlässig sowie mit geringen Kosten verbunden sind (PHUPHANIN et al., 2019). Hierbei werden Unterschiede in der Lichtabsorption gemessen, die durch die pulsatile Volumenveränderung der Blutgefäße während des Herzschlags entstehen (ANDRIANOV et al., 2020). Optische Messmethoden können bereits ab dem 6. Inkubationstag angewendet werden und eignen sich auch zur Langzeit-Messung (PHUPHANIN et al., 2019; YOUSSEF et al., 2020). PHUPHANIN et al. (2019) haben eine Methode etabliert, bei der ein herkömmliches Smartphone zur Videoaufnahme verwendet werden kann. Die Genauigkeit von optischen Messmethoden ist in der Humanmedizin vielfach verifiziert. LEWIN et al. (1997) konnten in einem Vergleich zwischen optischer Messung und EKG-Messung keine signifikanten Unterschiede feststellen. Folglich wird angenommen, dass optische Messmethoden auch bei aviären Embryonen zuverlässig angewendet werden können (PHUPHANIN et al., 2019).

3. Neurohumorale Parameter

3.1. Katecholamine beim Vogel

Katecholamine sind im Plasma von Vögeln zirkulierende Amine. Untersuchungen zu zirkulierenden Katecholaminen wurden hauptsächlich bei Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) und Moschusenten (*Cairina moschata*) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt (CARSIA, 2022). Es scheint jedoch große Unterschiede zwischen verschiedenen Vogelspezies zu geben (GHOSH et al., 2001). Katecholamine werden hauptsächlich in den chromaffinen Zellen der Nebennieren synthetisiert und zudem in postganglionären sympathischen Nervenendigungen und spezifischen Neuronen des ZNS. Dort werden aus L-Tyrosin durch die Tyrosin-Hydroxylase die Katecholamine Dopamin (DOPA), Epinephrin (E) und Norepinephrin (NE) synthetisiert (CARSIA, 2022). Die Nebennieren bestehen beim Vogel aus den Steroiden synthetisierenden adrenocorticalen Zellen und den chromaffinen adrenomedullären Zellen (CARSIA, 2022). Die adrenocorticalen Zellen sind in parallelen säulenartigen Strukturen angeordnet, zwischen denen sich Inseln von chromaffinen Zellen befinden (CARSIA, 2022). Beim Huhn existiert subkapsulär eine Schicht ausschließlich aus chromaffinen Zellen (HUMAYUN et al., 2012). Das Verhältnis von adrenocorticalen zu chromaffinen Zellen beträgt ungefähr 1,5:1, wobei es in der Peripherie größer ist als im Zentrum (HOLMES & PHILLIPS, 1976; HUMAYUN et al., 2012).

Die Freisetzung von Katecholaminen wird durch den Mechanismus der Reiz-Sekretions-Kopplung gesteuert. Durch einen präganglionären Nervenimpuls wird Acetylcholin freigesetzt, welches an seine Rezeptoren bindet, um die chromaffinen Zellen zu depolarisieren. Es kommt folglich zum Einstrom von Calcium-Ionen, wodurch es zur Exozytose der sekretorischen Granula kommt. Zusammen mit den Katecholaminen werden auch einige Neuropeptide, Chromogranine und Sekretogranine freigesetzt (CARSIA, 2022). Gemäß OHMORI (1998) sezernieren 70 % der chromaffinen Zellen beim Huhn E. KNIGHT und BAKER (1986) konnten an isolierten Zellen keine situationsabhängige Präferenz eines der Katecholamine bei der Freisetzung feststellen. Es wird jedoch angenommen, dass das Verhältnis der freigesetzten Katecholamine durch Hormone und andere Faktoren bestimmt wird (GHOSH et al., 2001). Die Konzentration von zirkulierendem NE folgt im Gegensatz zu E beim Huhn einem tagesabhängigen

Rhythmus (CARSIA, 2022). Ferner wird angenommen, dass die postganglionäre adrenerge Innervation der Nebennieren an der Synthese und Freisetzung von Katecholaminen beteiligt ist, wobei bei einigen Spezies vermutlich auch ein nicht neurogener Mechanismus eine Rolle spielt (GHOSH et al., 2001). Die Ausscheidung der Katecholamine erfolgt über die Niere, nachdem sie zuvor v. a. in der Leber durch die Enzyme Katecholamin-O-methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) degradiert wurden (GHOSH et al., 2001).

Die Nebennieren sind die wichtigste Quelle für die Freisetzung von Katecholaminen als erste Reaktion auf akute Stressoren („fight or flight“-Antwort) (BUTLER & WILSON, 1985; LACOMBE & JONES, 1990). Im Gegensatz zu Säugetieren stammt bei Vögeln neben dem stressbedingt freigesetzten E auch 70 – 80 % des zirkulierenden NE aus den Nebennieren (LACOMBE & JONES, 1990). E verursacht eine unmittelbare Stimulation der Glycogenolyse in der Leber, um Glucose für die wichtigsten Organe in der Stresssituation bereitzustellen (CARSIA, 2022). Die Folge ist ein unmittelbarer Anstieg der Glucosekonzentration im Blut (THURSTON et al., 1993). Zudem wird insbesondere durch NE die Gluconeogenese stimuliert (CRAMB et al., 1982). Bei Kältestress interagieren Katecholamine auch mit Glucagon, um die Erzeugung von Wärme zu fördern (ABDELMELEK et al., 2001; FILALI-ZEGZOUTI et al., 2005). Außerdem greifen Katecholamine in die Regulation des Fettstoffwechsels ein. Die Lipolyse in Fettzellen wird durch E stimuliert, wohingegen die Lipogenese in der Leber durch E gehemmt wird (CAMPBELL & SCANES, 1985). Des Weiteren wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch die freigesetzten Katecholamine auf allen Ebenen verstärkt. Hierdurch kommt es schließlich zu einer vermehrten Freisetzung von Glucocorticoiden. Die Wirkung der Katecholamine wird wiederum durch Glucocorticoide moduliert. Sie reduzieren die Konzentrationen von COMT und MAO, verhindern die Wiederaufnahme von Katecholaminen in sympathische Nervenenden und erhöhen die Sensitivität adrenerger Rezeptoren (CARSIA, 2022). Darüber hinaus haben Katecholamine weitere metabolische Effekte, indem sie mit anderen Hormonen wie Insulin, Prolactin, Wachstums- und Schilddrüsenhormonen interagieren sowie diverse Effekte auf Immunzellen haben (CARSIA, 2022).

Am aviären Herzen wirken Katecholamine primär über β -adrenerge Rezeptoren an den Zellen des Myokards und den Schrittmacherzellen. E und NE verursachen am

Herzen eine Erhöhung der Depolarisation der Schrittmacherzellen und eine Erhöhung der Kontraktionskraft. Während bei Säugetieren E potenter ist, weist bei Vögeln NE eine potentere inotrope und chronotrope Wirkung auf. NE und E erhöhen die Herzauswurfleistung, indem sie die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz des Herzens erhöhen sowie eine durch periphere Vasokonstriktion verursachte Hypertension hervorrufen (DZIALOWSKI & CROSSLEY, 2022).

3.2. Katecholamine beim Hühnerembryo

Katecholamine sind schon sehr früh in der Embryonalentwicklung detektierbar. Diese sind mütterlichen Ursprungs und werden in großen Mengen im Dotter gespeichert, von wo sie durch Diffusion oder die Blutzirkulation in den Embryo gelangen (EPPLÉ et al., 1992). BOUCEK und BOURNE (1962) haben Katecholamine am 4. Inkubationstag im homogenisierten Embryo detektiert, ohne diese weiter zu differenzieren. DOPA wurde dann im Embryo am 2. Inkubationstag, E und NE am 3. Inkubationstag von IGNARRO und SHIDEMAN (1968b) detektiert. Im Herzen wurden E und NE ebenso ab dem 3. Inkubationstag festgestellt, während DOPA ab dem 6. Inkubationstag nachgewiesen wurde (IGNARRO & SHIDEMAN, 1968b). Ebenso wurde in den ersten Tagen der Embryonalentwicklung bereits eine Aktivität der Enzyme zur Synthese der Katecholamine detektiert. Außerdem ist ab dem 4. Inkubationstag die Degradierung der Katecholamine durch COMT und MAO in Herz und Leber festzustellen (IGNARRO & SHIDEMAN, 1968a, 1968b). Ab dem 9. Inkubationstag konnten E und NE auch in den Nebennieren nachgewiesen werden (LEIBSON & STABROVSKI, 1962).

Die Entwicklung der Nebennieren beginnt beim Hühnerembryo mit einem adrenogenitalen Primordium, welches ab dem 3. Inkubationstag vorhanden ist (CARSIA, 2022). Um den 5. Inkubationstag teilt sich das adrenogenitale Primordium in Nebennieren- und Gonadengewebe auf (SMITH et al., 1999). Vom 7. bis 15. Inkubationstag wandern chromaffine Zellen in die Nebennieren ein (CARSIA, 2022). Diese stammen von einer Zellpopulation aus der kaudalen thorakalen Neuralleiste, den sog. sympathoadrenalen Vorläuferzellen, ab (SHTUKMASTER et al., 2013). Um den 2. Inkubationstag lösen sich diese Zellen von der Neuralleiste und wandern nach ventral zur dorsalen Aorta, wo sie katecholaminerge Eigenschaften erlangen. Anschließend erreichen die Zellen die Nebennierenregion um den 6. Inkubationstag. Die Zellen transformieren dann vom

neuronalen zum chromaffinen Typ. Nach FUJITA et al. (1976) sind die Nebennieren um den 10. Inkubationstag funktional. Nach CARSIA (2022) ist die Migration der chromaffinen Zellen jedoch erst am 15. Inkubationstag abgeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt werden die Nebennieren auch durch ACTH aus der Hypophyse kontrolliert (CARSIA, 2022). Bisher ist unklar, inwiefern die Nebennieren für die Bereitstellung von Katecholaminen beim Embryo relevant sind, da Katecholamine auch aus neuronalen Quellen stammen können (CARSIA, 2022).

In Blutplasma, Allantois und Amnion wurden E, NE und DOPA von EPPLE et al. (1992) ab dem 10. Inkubationstag gemessen. BOUCEK und BOURNE (1962) konnten bereits am 5. Inkubationstag Katecholamine in der Allantoisflüssigkeit messen, ohne diese weiter zu differenzieren. Mehrere Publikationen stimmen dahingehend überein, dass die Konzentrationen von zirkulierenden Katecholaminen mit Ausnahme von NE zum Schlupf hin ansteigen (BOUCEK & BOURNE, 1962; EPPLE et al., 1992; MULDER et al., 2000; VON BLUMRÖDER & TÖNHARDT, 2002). Es wird zudem angenommen, dass NE eine wichtige Rolle beim Schalendurchbruch und Schlupf des Huhns spielt (CARSIA, 2022). Plasmakatecholaminwerte sind am Ende der Inkubationszeit deutlich höher als sie für Säugetierföten in der gleichen Entwicklungsphase angegeben werden (MULDER et al., 2000). Zudem sind die Plasmakonzentrationen von E und DOPA beim Hühnerembryo deutlich höher als bei adulten Hühnern, wohingegen die NE-Konzentration ähnliche Werte wie beim adulten Huhn erreicht (EPPLE et al., 1992). Außerdem haben EPPLE et al. (1992) vom 10. bis 14. Inkubationstag einen deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration von E detektiert, was sie auf die einsetzende Synthese in den Nebennieren zurückführen. Beim nicht gestressten Embryo weisen die Katecholaminkonzentrationen in Plasma und Allantois ähnliche Werte auf (EPPLE et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen von E und NE in der Amnionflüssigkeit deutlich niedriger (EPPLE et al., 1992; GILL et al., 1994). Im Amnion werden folglich die Konzentrationen von E und NE im Vergleich zu Plasma und Allantois deutlich niedriger gehalten (EPPLE et al., 1997). Für DOPA scheint beim nicht gestressten Embryo ein Gleichgewicht zwischen Plasma, Allantois und Amnion zu bestehen (EPPLE et al., 1997). Für konjugierte Katecholamine scheint das Amnion eine fast vollständige Barriere darzustellen (GILL et al., 1994). Eine Übersicht über die Katecholaminkonzentrationen beim

nicht gestressten Embryo ist in Tabelle 4 gegeben.

Tabelle 4: Baseline-Konzentrationen von DOPA, NE und E in pg/ml in Plasma, Allantois und Amnion des Hühnerembryos an Inkubationstag 13 (modifiziert nach EPPLE et al. (1992), GILL et al. (1994) und EPPLE et al. (1997)).

	Plasma	Allantois	Amnion
DOPA (pg/ml)	1100	1100	1130
NE (pg/ml)	1100	1100	320
E (pg/ml)	1100	1100	520

Die Reaktion von Katecholaminen auf Stressoren wurde beim Hühnerembryo von EPPLE et al. (1992) intensiv untersucht. Unmittelbar nach einem Stressor kommt es in der Regel zu einem Anstieg der Katecholaminkonzentrationen im Plasma, gefolgt von einem Anstieg der Konzentrationen in der Allantois innerhalb weniger Minuten. Beim gestressten Embryo sind E und DOPA in der Allantoisflüssigkeit in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden als im Plasma. Bei NE hingegen liegt die Konzentration unter der im Blutplasma (EPPLE et al., 1992). Die Katecholamine akkumulieren in der Allantois und werden von dort langsam wieder abgegeben (EPPLE et al., 1992). EPPLE et al. (1992) gehen davon aus, dass dieser Puffermechanismus eine Desensibilisierung der Rezeptoren verhindert. Zudem können nach und nach nicht stimulierende Mengen von Katecholaminen in die Zirkulation zurückgegeben werden, um in endokrinen und neuronalen Geweben wiederverwendet oder metabolisch abgebaut zu werden (EPPLE et al., 1992; EPPLE et al., 1997). Die Fähigkeit der Allantois zur Akkumulation von Katecholaminen scheint mit voranschreitender Embryonalentwicklung zuzunehmen. EPPLE et al. (1992) haben vom 10. bis 14. Inkubationstag einen Anstieg von DOPA festgestellt, der in der Allantois deutlich ausgeprägter war als im Plasma. Sie gehen daher davon aus, dass die Fähigkeit der Allantois DOPA zu akkumulieren mit voranschreitender Embryonalentwicklung zunimmt. Neben freien Katecholaminen sind in der Allantoisflüssigkeit außerdem sulfatierte Katecholamine, konjugierte Steroide und mindestens 40 Aminosäuren zu finden (GILL et al., 1994; EPPLE et al., 1997). Für freie Steroide und Schilddrüsenhormone stellt die Allantois hingegen eine Barriere dar (EPPLE et al., 1997). Die Allantois scheint folglich ein Depot für wichtige Metaboliten und Botenstoffe darzustellen, welches für den Embryo ein wichtiger Mechanismus zur Entfernung von Metaboliten aus der Blutzirkulation ist. Durch welche Hormone dieses reguliert wird ist bisher unklar (EPPLE et al., 1997).

Aufgrund der hohen Katecholaminkonzentrationen und der ausreichenden Menge an Flüssigkeit eignet sich die Allantois gut zur Probennahme und Bestimmung von Katecholaminkonzentrationen (EPPLÉ et al., 1997). BOUCEK und BOURNE (1962) konnten eine Probennahme aus der Allantois erstmals am 5. Inkubationstag durchführen, am 4. Inkubationstag war das Volumen noch zu gering. EPPLÉ et al. (1992) bestimmten die Konzentrationen mittels radioenzymatischer Technik, während GILL et al. (1994) und MULDER et al. (2000) eine HPLC durchführten.

Die Reaktion der Katecholamine unterscheidet sich je nach Stressor. NE zeigt häufig eine entgegengesetzte Reaktion zu E und DOPA, was darauf hindeutet, dass es zum Teil aus anderen z. B. paraganglionären Quellen stammt (EPPLÉ et al., 1992). EPPLÉ et al. (1992) konnten bereits am 10. Inkubationstag nach Manipulation des Eis (kleines Loch in der Schale und Entnahme von Allantoisflüssigkeit) einen Anstieg von E, NE und DOPA innerhalb von 10 Minuten beobachten. Außerdem kam es am Inkubationstag 14 nach Asphyxie zu einem signifikanten Anstieg der NE-Konzentration in Plasma- und Allantoisflüssigkeit. Vergleichbar damit haben MULDER et al. (2000) ab dem 13. Inkubationstag einen Anstieg der Plasmakonzentrationen von E und NE nach akuter Hypoxie beobachtet. Dieser Anstieg und das Verhältnis von E zu NE wurden bis Inkubationstag 19 zunehmend größer, was nahelegt, dass die katecholaminerge Reaktion auf Stressoren mit der fortschreitenden Embryonalentwicklung reift (MULDER et al., 2000). Nach Hypothermie (22 °C, 10 Min) haben EPPLÉ et al. (1992) am Inkubationstag 14 einen Anstieg von E, NE und DOPA detektiert. GILL et al. (1994) haben zudem einen signifikanten Konzentrationsabfall von sulfatiertem NE in der Allantois beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Reaktion auf Hyperthermie (42 °C, 10 Min) festgestellt werden (EPPLÉ et al., 1992; EPPLÉ et al., 1997). Eine wiederholte Probennahme aus der Allantois führte trotz Flüssigkeitsersatz zum Anstieg der NE-Konzentration, was EPPLÉ et al. (1992) folglich nicht auf den Verlust von Flüssigkeit zurückführen, sondern auf den Prozess der Probennahme.

III. ERWEITERTER MATERIAL- UND METHODENTEIL – VERSUCHSAUFBAU NEUROHUMORALE PARAMETER

1. Vorbereitung der Hühnerembryonen

Befruchtete Eier der Rasse Lohman Selected Leghorn wurden in einem Inkubator (Favorit-Olymp 192 Spezial, HEKA-Brutgeräte, Rietberg, Deutschland) 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 ED 0 gezählt wurde. Bis ED 3 wurden die Eier sechsmal am Tag gewendet, anschließend fenestriert (siehe Kapitel IV) und danach in einer horizontalen Position bis zum Versuchstag weiterbebrütet. Die Vitalität der Hühnerembryonen wurde täglich kontrolliert.

Die Experimente wurden unter standardisierten Bedingungen in einer speziell angefertigten Wärmekammer durchgeführt (siehe Kapitel IV). 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. Vor der Probennahme wurde die Folie vom Ei entfernt und die Schale heruntergeschnitten, sodass die Öffnung der Fenestrierung erweitert wurde.

2. Versuchssetup

Die Studie war explorativ angelegt. Zunächst wurde die Blutentnahme an einer Vene der CAM für die Blutplasmagewinnung angestrebt. Dies stellte sich allerdings 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. Um einen noxischen Stimulus zu applizieren, war eine Eröffnung des Amnions unumgänglich. Deshalb musste zusätzlich zur Allantois das Amnion eröffnet werden, was zu einer Durchmischung beider Flüssigkeiten führte.

In der Versuchsgruppe wurden $n = 6$ Embryonen pro ED von ED 15 bis 18 in fenestrierten Eiern untersucht. Sie erhielten einen noxischen mechanischen Reiz mit einer chirurgischen Klemme an der Schnabelbasis (*Pinch*). Als negative Kontrollgruppe wurde für jeden untersuchten ED eine Gruppe von jeweils $n = 6$ Embryonen mitgeführt, bei denen die Schnabelbasis mit der Klemme nur leicht berührt wurde (*Touch*). Mit Hilfe einer 0,5 ml Spritze und einer 8 mm langen 30 G Nadel wurden 250 μ l Allantois-/Amnionflüssigkeit 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).

3. Probenanalyse

Die Proben wurden mit EGTA (Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) versetzt und unmittelbar nach Entnahme zentrifugiert (RCF = 2000 g, 10 Min), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

IV. PUBLIZIERTE STUDIENERGEBNISSE

Nociception in Chicken Embryos, Part I: Analysis of Cardiovascular Responses to a Mechanical Noxious Stimulus

By Larissa Weiss ¹, Anna M. Saller ¹, Julia Werner ¹, Stephanie C. Süß ¹, Judith Reiser ¹, Sandra Kollmansperger ², Malte Anders ², Heidrun Potschka ³, Thomas Fenzl ², Benjamin Schusser ⁴ and Christine Baumgartner ^{1,5,*}

¹ Center for Preclinical Research, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany

² Clinic for Anesthesiology and Intensive Care, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany

³ Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Germany

⁴ Reproductive Biotechnology, TUM School of Life Sciences, Technical University of Munich, 85354 Freising, Germany

⁵ Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Germany

* Author to whom correspondence should be addressed

Animals 2023, 13(17), 2710; <https://doi.org/10.3390/ani13172710>

Submission received: 20 July 2023 / Revised: 18 August 2023 / Accepted: 23 August 2023

/ Published: 25 August 2023

1. Simple Summary

Chicken embryos are frequently not protected by animal welfare laws. However, they are used in various research areas, and male embryos are commonly killed in food production as an alternative to culling day-old chicks. Increasing knowledge regarding the onset of nociception and pain perception in chicken embryos is fundamental for animal welfare protection. The aim of this exploratory study was to further narrow down the period when chicken embryos acquire the capacity for nociception. Therefore, changes in blood pressure and heart rate after the introduction of a noxious stimulus were assessed during the embryonic development of chickens. Embryos from 16 days of incubation onward showed cardiovascular changes after a noxious mechanical stimulus was introduced at the base of the beak, indicating a nociceptive response.

2. Abstract

Although it is assumed that chicken embryos acquire the capacity for nociception while developing in the egg, an exact time point has not yet been specified. The present research was an exploratory study aiming to determine when the capacity of nociception emerges during embryonic development in chickens. Changes in blood pressure and heart rate (HR) in response to a noxious mechanical stimulus at the base of the beak versus a light touch on the beak were examined in chicken embryos between embryonic days (EDs) 7 and 18. Mean arterial pressure (MAP) was the most sensitive parameter for assessing cardiovascular responses. Significant changes in MAP in response to a noxious stimulus were detected in embryos at ED16 to ED18, whereas significant changes in HR were observed at ED17 and ED18. Infiltration anesthesia with the local anesthetic lidocaine significantly reduced the response of MAP on ED18, so the measured cardiovascular changes may be interpreted as nociceptive responses.

3. Introduction

In present times, animal welfare has increasingly become the focus of public attention regarding farm and laboratory animals. Consequently, the culling of male day-old chickens for economic reasons is increasingly questioned. A large proportion of the male offspring in the layer industry are killed after hatching, as the fattening of male layer-type chickens is not economically profitable [1]. In the

EU, 330 million male chicks are killed annually through maceration or gassing [2], which is currently the subject of a major discussion. Germany and France have already adapted their laws and banned the killing of male day-old chicks for economic reasons, although there is not yet an EU-wide regulation [3]. As an alternative, *in ovo* sex determination with subsequent killing of male embryos is already being practiced [4]. However, it is important for animal welfare reasons and for the public acceptance of *in ovo* sex determination that related culling be conducted at an early stage of development when nociception and the perception of pain are not yet possible [4,5]. According to current knowledge, methods of *in ovo* sex determination are reliably applicable from the 9th day of incubation at the earliest [1]. Methods that can be applied in the first trimester of embryonic development are still in development under laboratory conditions [4].

Furthermore, chicken embryos are of great importance for biomedical research because of the advantages they provide in terms of fast growth and because of their good accessibility in various research areas, such as developmental biology, toxicology, cancer research and drug development [6,7]. Under European regulations, interventions and treatments on chicken embryos are not considered animal experiments and even count as a replacement method in the context of the 3R principles [8]. At this time, there are no regulations regarding anesthesia and analgesia of chicken embryos during painful interventions [6,8]. Greater clarity regarding the period during which chicken embryos are capable of nociception and pain sensation would lead to improved animal welfare in research.

In pain research, a fundamental distinction is made between nociception and the perception of pain [9]. Although nociception is the detection of a potentially tissue-damaging stimulus and its transmission by the nociceptive component of the nervous system [10,11], pain is characterized by a subjective, conscious sensory perception, usually triggered by nociception [12,13]. Nociception and pain are progressive adaptive processes that gradually develop throughout the fetal period [14]. It is considered confirmed that the chicken embryo acquires the capacity for nociception at some point during the 21-day developmental period in the egg [8,15]. However, the question of the exact time point at which nociception or even pain sensation can be presumed is controversial. In several publications, researchers agree that nociception and pain perception are not possible in the first trimester of embryonic development in the chicken [4,15]. A requirement for the ability to

perceive pain is the existence of functional pathways that enable the transmission of stimuli to the brain [12,14]. Although the first sensory afferent nerve fibers develop on incubation day 4, the closure of multisynaptic reflex arcs does not occur until day 7 [16–18]. It is described in the literature that the chicken embryo develops a functional brain on day 13 [15,19]. However, it is only confirmed that the brain does not show any electrical activity until 6.5 days of incubation [20]. Pain sensation is therefore considered impossible up to incubation day 7, but beyond that, no specific time point can be defined from which the chicken embryo is capable of nociception and pain sensation [4,15].

Because self-reporting, which is the gold standard in humans to detect pain [21], is not possible as a direct method of pain evaluation in animals, indirect methods such as the alteration of physiological and behavioral parameters must be resorted to [22]. Changes in heart rate (HR) and blood pressure are therefore used as clinical indicators of nociception and pain [23].

This study is part of a comprehensive study in which the nociceptive ability of chicken embryos was investigated using cardiovascular parameters, behavioral observations and EEG. Here, we present the results of the cardiovascular study and, in particular, the implemented cardiovascular measurement methods regarding chicken embryos that were designed for investigation of the time point at which chicken embryos are able to respond to a noxious stimulus with a nociceptive cardiovascular response. The corresponding results of the EEG measurements and behavioral observations and the implemented techniques will be presented in further publications.

4. Materials and methods

4.1. Animals

Fertilized Lohman Selected Leghorn chicken eggs were obtained from the TUM Animal Research Center (Thalhausen) and stored at 15 °C. Embryonic day (ED) 0 was considered as the day when eggs were transferred to the incubator (Favorit-Olymp 192 Spezial, HEKA-Brutgeräte, Rietberg, Germany). The eggs were incubated for 7 to 18 days at 37.8 °C and 55% humidity and turned six times a day until they were fenestrated.

At ED3 of incubation, the eggshell was fenestrated [24]. For this purpose, the egg

was placed horizontally for at least two minutes, and then 5 to 7 mL albumen were withdrawn from the apical pole of the egg using a 5 mL syringe and an 18 G needle. The top of the egg was then covered with tape. A hole was cut in the shell, and the vitality of the embryo was verified. Next, 0.5 mL penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin/mL, P4333-100 mL Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added; the egg was then resealed with cling film and was further incubated in a horizontal position. The vitality of the embryos was checked daily until the end of the experiment. Experiments were conducted between 9:00 a.m. and 7:00 p.m. so that the variance in the age of the embryos within an ED was limited to a maximum of 10 h.

4.2. Experimental Design

This study was exploratory and was not preceded by an a priori power analysis. At ED12 to ED18, $n = 10$ embryos of each ED were measured. Due to higher losses in younger embryos, group sizes of $n = 6$ (ED9) and $n = 3$ (ED7) embryos were chosen. Furthermore, to study the effect of local anesthesia, $n = 6$ ED18 embryos were used.

Experiments were performed under standardized conditions in a specially designed heating chamber equipped with a heating lamp (ARTAS GmbH, Arnstadt, Germany) and an air humidifier (HU4811/10 Series 2000, Philips, Amsterdam, The Netherlands). The eggs were placed on a heating mat (ThermoLux, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Germany) in a bowl filled with warmed Armor Beads (Lab Armor Beads™, Sheldon Manufacturing, Cornelius, NC, USA). The mean temperature and mean humidity during all experiments were $37.7\text{ °C} \pm 0.8$ and $55.5\% \pm 4.3$, respectively.

A schematic representation of the experimental setup is shown in Figure 1. First, the cling film was removed from the egg, and the shell was carefully opened to the level of the chorioallantoic membrane (CAM). Using a microscope (Stemi SV6, Zeiss, Oberkochen, Germany), the allantoic and amniotic membranes were opened over the head of the embryo, avoiding any large vessels so that the beak could be reached in the further course of the experiment. A side branch of the chorioallantoic artery was prepared, temporarily ligated to avoid blood loss, and incised with microsurgical scissors. A microtip catheter (FISO-LS Fiber Optic Pressure Sensor, FOP-LS-PT9-10, FISO Technologies Inc., Quebec, QC, Canada) was then inserted into the vessel and fixed in place with a ligature. Systolic (SAP), diastolic (DAP)

and mean arterial pressure (MAP) as well as HR were recorded continuously every four seconds (PLUGSYS module, EIM-B, EIM-A, HAEMODYN Software v 2.0, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany, Evolution Software v 2.1.6.0, FISO Technologies Inc., Quebec, QC, Canada). The beak of the embryo was carefully placed on a Desmarres lid retractor. For younger embryos at ED7 and ED9, the beak was carefully placed on a custom-made wire loop.

After implementation of the catheter, a two-minute waiting period followed. Then, two mechanical stimuli were applied at the base of the beak. In randomized order, a noxious mechanical stimulus was applied with a surgical clamp (*Pinch*), and a light touch (*Touch*) was applied as a negative control. The two stimuli were delivered five minutes apart to allow the parameters to return to the baseline between the stimuli. After the second stimulus, measurements were continued for five more minutes. The measurement time between the two stimuli and after the second stimulus was reduced from five to three minutes for embryos at ED13 and younger due to the increasing sensitivity of the organism.

For the *Pinch*, a surgical clamp was applied to the base of the beak and squeezed. For *Touch*, the beak was only lightly touched with the surgical clamp. For both stimuli, a mosquito clamp was used for ED12 to ED18 embryos. For embryos at ED7 and ED9, the surgical clamp was too large, and microsurgical forceps were used instead for both stimuli. To ensure comparability, the stimuli were always applied by the same person. In the further course of the study, an analgesia meter (BIO-RP-M, BioSeb, Vitrolles, France) with customized tips of the mosquito clamp was used to monitor the pressure applied by the mechanical stimuli.

To verify whether the measured cardiovascular responses could be classified as nociceptive responses, a local anesthetic was applied to $n = 6$ ED18 embryos before stimulation. For this purpose, after the preparation and placement of the microtip catheter, 0.02 mL of lidocaine 2% (Xylocitin® 2%, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Germany) were injected into the upper and lower beak using a 30 G needle (*ED18 w/Lido Touch* and *Pinch*). The measurements were carried out following the same experimental protocol as for other ED14 to ED18 embryos with the exception that a waiting period of three minutes was added prior to the measurement. During this time, blood pressure and HR were monitored for the occurrence of side effects of lidocaine, such as bradycardia, arrhythmia or hypotension. As a comparison

group without lidocaine, the already measured ED18 embryos were used (*ED18 w/o Lido Touch and Pinch*).

Immediately after the end of the experiments, the embryos were euthanized by intravenous injection of pentobarbital sodium (Narcofen[®], 16 g/100 mL, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany; ED7–ED12: 0.1 mL; ED13–ED19: 0.2 mL) followed by decapitation.

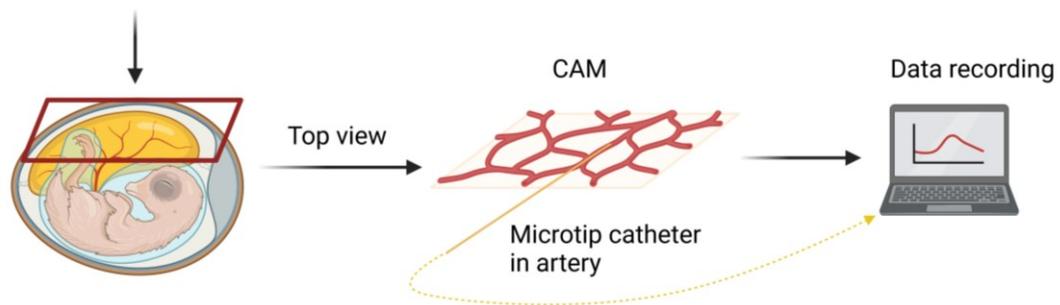


Figure 1. Schematic illustration of the experimental setup. A microtip catheter was inserted into a side branch of the chorioallantoic artery, and the values of blood pressure and heart rate (HR) were recorded every four seconds (created with BioRender.com).

4.3. Analysis

SAP, DAP, MAP and HR were recorded every four seconds. For the evaluation of the reactions to the stimuli, the means of MAP and HR were calculated over one minute before (=baseline) and one minute after the respective stimulus. To avoid any influence of the approach of the clamp, the 15 s immediately before the respective stimuli were introduced were not included as part of the baseline. In embryos showing a hyperacute decrease in HR with a subsequent increase in HR after *Pinch*, the decrease was not included in the calculation and was evaluated separately to avoid negation of opposite reactions. The deviation of the response after the stimulus (*Pinch/Touch*) as a percentage of the baseline value was then calculated. Differences in the percent changes to the baseline in MAP and HR after *Pinch* and *Touch* were tested for statistical significance. For normally distributed data, a paired *t*-test (two-tailed) was used. For data that failed the normality test, a Wilcoxon signed-rank test (two-tailed) was performed. For the comparison of multiple groups, either a one-way ANOVA (normally distributed) or a Kruskal–Wallis test (not normally distributed) was used. Additional information on statistical metrics can be found in Table S1.

5. Results

5.1. Increasing Arterial Pressure and Evolution of HR during Embryonic Development of the Chicken

SAP, DAP and MAP in the chorioallantoic artery and HR were recorded over one minute at ED7, ED9 and EDs 12 to 18. SAP, DAP and MAP increased with the age of the embryos (Table 1). ED7 showed the lowest MAP with a value of 2.08 mmHg \pm 0.40, and ED18 showed the highest MAP with a value of 17.28 mmHg \pm 3.04.

Table 1. Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP) and HR at embryonic day (ED) 7 (n = 3), ED9 (n = 6), and ED12 to ED18 (n = 10). Values are shown as the mean \pm standard deviation.

	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 2.45	13.73 \pm 2.38	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 33.12	151.35 \pm 36.44	179.08 \pm 29.18	176.07 \pm 35.75

5.2. Increase in MAP in Response to a Noxious Stimulus

The response of MAP to a noxious mechanical stimulus at the base of the beak (*Pinch*) was compared to the response to a light touch at the base of the beak as a negative control (*Touch*) in embryos between EDs 7 and 18. As shown in Figure 2, a significant increase in MAP was observed as a reaction to *Pinch* in embryos on ED16 ($p = 0.0008$, $r = 0.857$), ED17 ($p = 0.0020$, $r = 0.627$) and ED18 ($p = 0.0048$, $r = 0.778$). ED18 embryos showed the strongest response in MAP, with an increase of 15.52% \pm 12.36 from the baseline. In comparison, a deviation from the baseline of only 1.30% \pm 0.94 was detected in response to *Touch* on ED18. In embryos at ED7, ED9 and EDs from 12 to 15, no significant differences between the MAP responses to *Pinch* and *Touch* were detected, which can be seen in Figures S1 and S2.

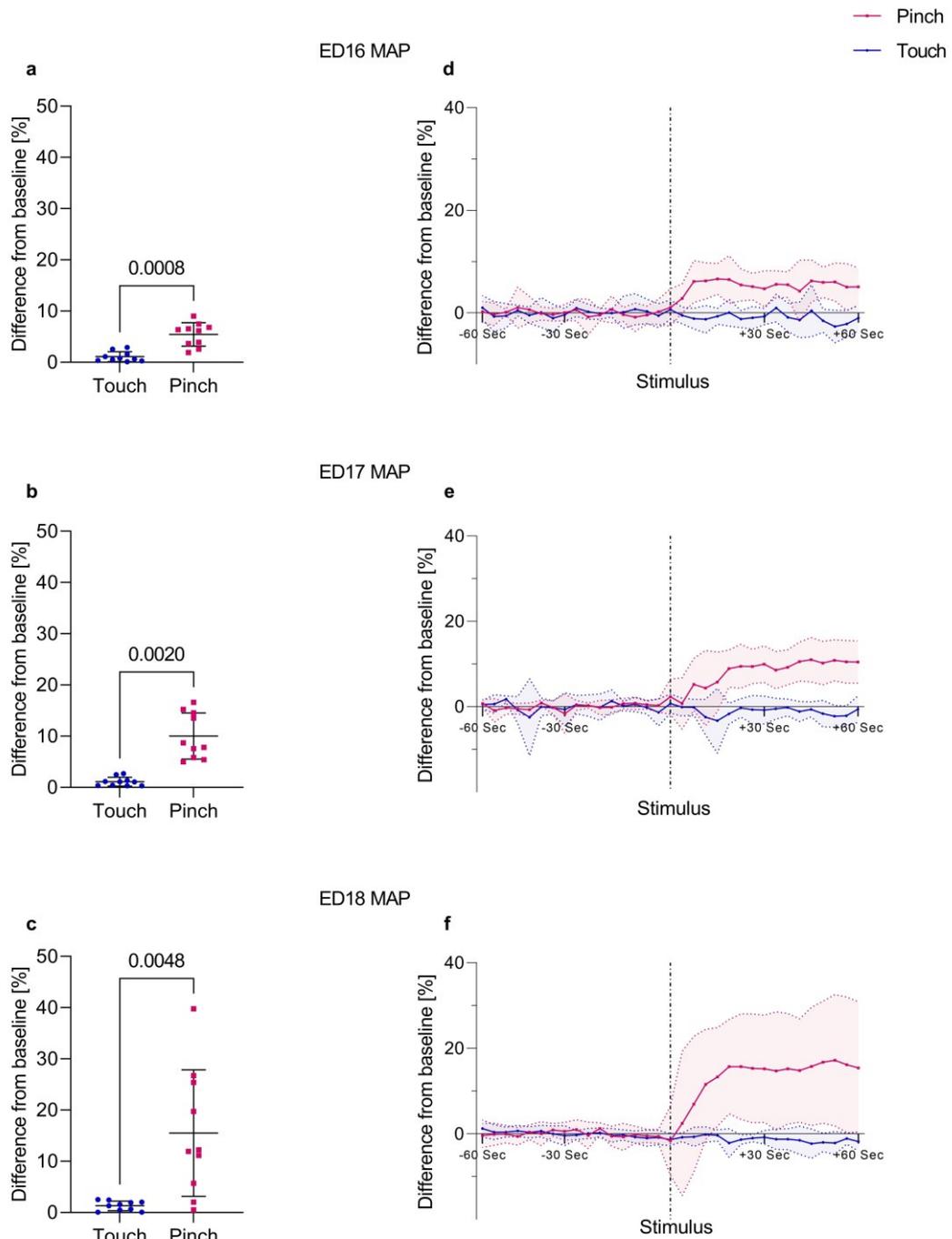


Figure 2. Percent change in MAP post *Touch* and *Pinch*. Embryos at EDs 16 to 18 ($n = 10$) received a noxious mechanical stimulus (*Pinch*) and a light touch as a negative control (*Touch*) at the base of the beak in randomized order. (a–c) Percent change from baseline MAP after *Pinch* compared to *Touch*. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t-test (normally distributed: a and c) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: b). Mean and p values shown; a: $p = 0.0008$, b: $p = 0.0020$, c: $p = 0.0048$. (d–f) Percent change from the baseline mean value of MAP over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (*Pinch* and *Touch*); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded).

5.3. Changes in HR in Response to a Noxious Stimulus

Regarding HR, two reaction patterns were observed, particularly in ED17 and ED18 embryos. In some embryos, HR immediately increased after *Pinch*. In other embryos, a hyperacute decrease in HR followed by an increase was observed in response to *Pinch*, as shown in Figure 3d–f. A change in HR of at least -15% with a subsequent increase of at least 5% from the baseline mean value after *Pinch* was observed in 80% of ED18 embryos and in 30% of ED17 embryos and was not detected after *Touch*. In embryos at ED18, HR decreased by up to $-48.54\% \pm 19.71$ over $9.50 \text{ s} \pm 6.02$ on average after *Pinch*. At ED17, these embryos showed a decrease in HR by up to $-41.87\% \pm 8.32$ over $16.00 \text{ s} \pm 6.93$ on average after *Pinch*. Simultaneous with the hyperacute decrease in HR, a slight decrease in MAP was also observed, particularly when the decrease in HR was large. In embryos at ED15 and ED16, the observations were inconsistent and could not be clearly distinguished from physiological variations in HR. In younger embryos, no hyperacute decrease in HR was observed in response to *Pinch*.

Significant increases in HR in response to *Pinch* compared to *Touch* were detected in embryos at ED17 ($p = 0.0148$, $r = 0.708$) and ED18 ($p = 0.0154$, $r = 0.705$) (Figure 3a–c). Embryos at ED18 showed the largest increase in HR after *Pinch*, with a deviation of $5.14\% \pm 3.60$ from the baseline, compared to a deviation of only $2.07\% \pm 1.20$ from the baseline after *Touch*. At ED7, ED9 and EDs 12 to 16, no significant changes in HR were observed, as shown in Figures S3 and S4.

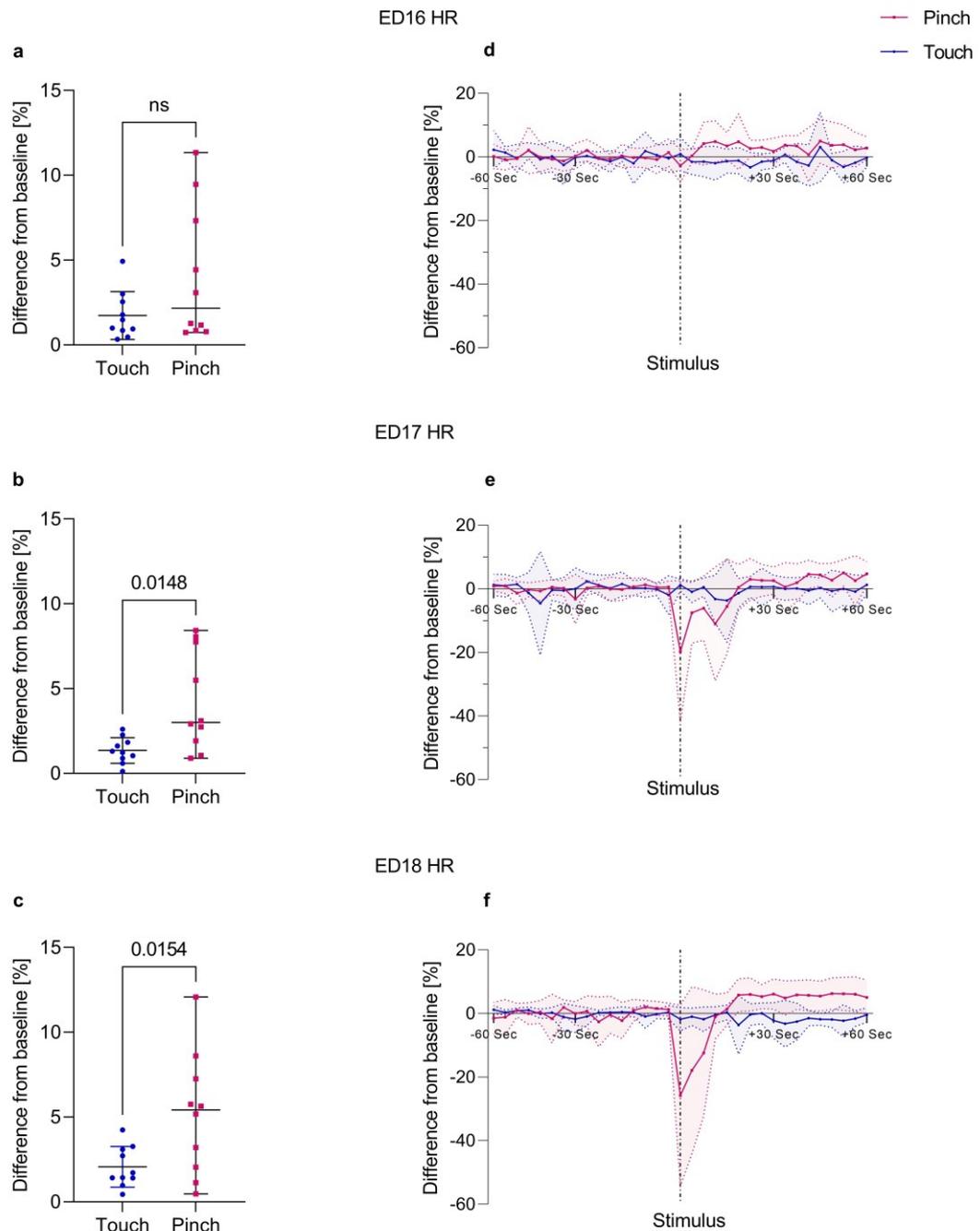


Figure 3. Percent change in HR post *Touch* and *Pinch*. Embryos at EDs 16 to 18 ($n = 10$) received a noxious mechanical stimulus (*Pinch*) and a light touch as a negative control (*Touch*) at the base of the beak in randomized order. (a–c) Percent change from baseline HR after *Pinch* compared to *Touch*. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t-test (normally distributed: b and c) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: a). Mean and p values shown; b: $p = 0.0148$, c: $p = 0.0154$; ns = no significant difference between the groups (a). (d–f) Percent change from the baseline mean value in HR over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (*Pinch* and *Touch*); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded).

5.4. Reduction of Cardiovascular Response by Local Anesthesia

The application of the local anesthetic lidocaine (*Lido*) at the base of the beak prior to stimulation significantly reduced the MAP increase in response to *Pinch* in embryos at ED18. Compared to the group without local anesthesia (*ED18 w/o Lido*), which showed an increase of $15.52\% \pm 12.36$ post *Pinch*, the increase in MAP was reduced to $5.00\% \pm 3.42$ in the group that received lidocaine (*ED18 w/Lido*). As represented in Figure 4a,c, the *ED18 w/o Lido Pinch* group showed the largest increase in MAP in response to *Pinch*, exceeding those of the *ED18 w/o Lido Touch* ($p = 0.0007$), *ED18 w/Lido Touch* ($p = 0.0031$) and *ED18 w/Lido Pinch* ($p = 0.0397$) groups, with an effect size of $\eta^2 = 0.467$.

The changes in HR in response to *Pinch* were slightly reduced by the application of lidocaine. However, a significant difference in HR was observed only between *ED18 w/o Lido Pinch* and *ED18 w/Lido Touch* ($p = 0.0097$), as displayed in Figure 4b. In the group treated with lidocaine (*ED18 w/Lido*), no embryo showed a hyperacute change in HR of -15% with a subsequent increase of 5% from the baseline mean value after the stimulus, but this reaction pattern was observed in 80% of the embryos in the *ED18 w/o Lido Pinch* group. A slight decrease in HR after *Pinch* was also observed in the local anesthetic group (*ED18 w/Lido Pinch*), but this decrease could not be distinguished from physiological variations in HR (Figure 4d).

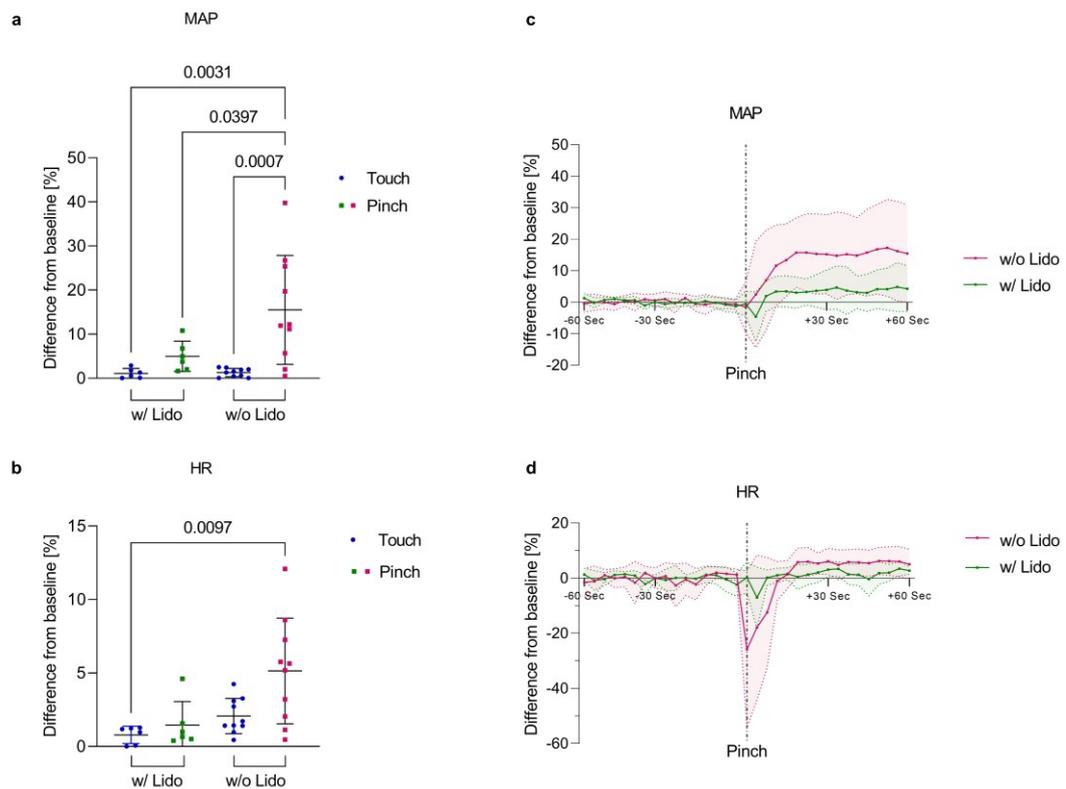


Figure 4. Local anesthesia control group. Percent change in MAP and HR post *Touch* and *Pinch*. ED18 embryos either received a lidocaine injection (*ED18 w/Lido*; $n = 6$) or no lidocaine injection (*ED18 w/o Lido*; $n = 10$) at the base of the beak prior to stimulation (*Touch* and *Pinch*). (a) Percent change from baseline MAP after *Pinch* in the group without lidocaine (*ED18 w/o Lido Pinch*) compared to *ED18 w/o Lido Touch*, *ED18 w/Lido Touch* and *ED18 w/Lido Pinch*. Displayed as the mean \pm standard deviation. One-way ANOVA (normally distributed); mean and p values shown. (b) Percent change from baseline HR after *Pinch* in the group without lidocaine (*ED18 w/o Lido Pinch*) compared to *ED18 w/o Lido Touch*, *ED18 w/Lido Touch* and *ED18 w/Lido Pinch*. Displayed as the mean \pm standard deviation. Kruskal–Wallis test (not normally distributed); mean and p values shown. (c,d) Percent change from the baseline mean value in MAP and HR after *Pinch* over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (*ED18 w/o* or *w/Lido Pinch*); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded).

6. Discussion

This study successfully developed methods to record blood pressure and HR in chicken embryos between EDs 7 and 18. Cardiovascular changes in response to a noxious mechanical stimulus at the base of the beak were investigated with the aim of identifying the onset of nociception during embryonic development in chickens.

Although there are many well-established noninvasive methods for determining HR in chicken embryos [25–27], direct intra-arterial measurement is the gold standard

for recording blood pressure [28]. In the past, blood pressure in chicken embryos was measured using glass capillaries or needle catheters inserted into an embryonic artery [29–31]. Corresponding to prior descriptions in the literature [29–31], an increase in arterial blood pressure with increasing age of the embryos was observed in the present study, but there were no major differences in HR between the EDs. Thus, the optical measurement of arterial blood pressure and HR with a microtip catheter represents a reliable method for invasive measurement of blood pressure and HR in chicken embryos. However, insertion of the catheter was particularly challenging at ED7 and ED18 due to the small size of the chorioallantoic vessels at ED7 and the beginning regression of the chorioallantoic vessels at ED18.

Because self-reporting is not possible in animals, it is difficult to evaluate their pain perception [22]. On the other hand, nociceptive reactions to a noxious stimulus can be measured [13]. The recording of cardiovascular parameters is well suited to the clinical evaluation of nociception in animals, including birds [32,33]. In the present study, the acquisition of cardiovascular parameters could be established for chicken embryos between EDs 7 and 18. Blood pressure and HR are mainly influenced by the autonomic nervous system [34]. Transmission of a noxious stimulus to the central nervous system results in activation of the sympathetic nervous system, which usually leads to an increase in blood pressure and HR [34]. Therefore, recording cardiovascular variables is considered the gold standard for the detection of nociception under anesthesia [35].

As a means of assessing the cardiovascular response of the chicken embryo to a noxious mechanical stimulus at the base of the beak, MAP was found to be the most sensitive parameter in the present study. Significant differences in MAP between *Pinch* and *Touch* were detected earliest on ED16 (Figure 2), whereas significant changes in HR were only observed in ED17 and ED18 embryos (Figure 3). Effect sizes were high, indicating the clinical relevance of the findings. Although there was a distinct increase in MAP in response to *Pinch* that reached over 10% deviation from the baseline in ED17 and ED18 embryos, the changes in HR were variable, and there were not necessarily any associations between changes in MAP and HR. Similar observations have been reported in adult chickens [36]. MAP has also been described in other studies concerning nociceptive responses in mammals as the most sensitive indicator of nociception [34,37].

A prerequisite for cardiovascular response to external stimuli is functional

regulation of the cardiovascular system. Blood pressure in the chicken embryo is mainly regulated by the sympathetic nervous system [38]. The adrenergic tone in the cardiovascular system is considered to be present from a point in time that is halfway through the incubation period [39,40]. Therefore, the sympathetic influence on blood pressure is expected to be functional from approximately ED10 [39]. In the heart, adrenergic and cholinergic receptors are already functional on ED4 [41]. Changes in HR due to alterations in environmental conditions such as oxygen levels and temperature have already been observed on ED3 [42]. In the present study, significant changes in HR after a noxious stimulus was introduced were not observed until ED17 (Figure 3).

Another prerequisite for the assessment of a nociceptive response is functioning stimulus transmission. Despite some differences in the nervous system, the processing of noxious stimuli in birds is comparable to that in mammals [13]. C-fibers and A-delta fibers have been found in chickens, innervating the beak, nasal and buccal mucosa as well as the legs [11,43]. High-threshold mechanothermal nociceptors are polymodal and respond to mechanical lesions, elevated temperatures and chemical insult [13]. It is believed that injuries to the beak can be highly painful for the bird [43], because the beak tip is an intensely innervated area [44], and both the upper and the lower portions of the beak contain nociceptors [45]. Reflective reactions such as movements of the head to mechanical and thermal stimuli and to needle punctures appear for the first time in the skin area of the beak on ED7 [46]. Therefore, in the present study, the application of a noxious stimulus to the base of the beak was chosen to evoke the highest possibility for a nociceptive response.

Regarding HR, irregularities appeared spontaneously over the whole measurement period, even at the baseline. Mainly short decelerations in HR were observed, whereas MAP was not affected. It has already been reported in several publications that HR irregularities physiologically occur at the end of the second week of incubation [47–50]. Nevertheless, the HR irregularities did not have a great influence on the calculation of the mean. Minor changes in DAP corresponded to the HR irregularities, but the analysis showed that MAP was not affected. In contrast to physiological variations in HR, a hyperacute decrease in HR with a subsequent increase could be clearly identified as a response to *Pinch* in 30% of ED17 and 80% of ED18 embryos. This reaction pattern could be distinguished from

physiological variations in HR by the finding that after *Pinch*, HR decreased by at least -15%, followed by a sustained increase in HR by at least 5% from the baseline mean value. The decrease in HR after *Pinch* was also accompanied by a short decrease in MAP followed by an increase. A decrease in HR as a reaction to a noxious stimulus has been reported in adult chickens [36] and in mammals [51,52] and may be due to a vasovagal reflex to a noxious stimulus [53]. However, only a few individual embryos showed a hyperacute decrease in HR after *Pinch*, which shows that the response in HR to a noxious stimulus varies among individuals. Variable responses in HR after a noxious stimulus have also been described in adult chickens [36]. Considering these different observations regarding HR, it is difficult to draw conclusions about the presence of nociception. Thus, HR should not be used as a single parameter for evaluating a nociceptive response in chicken embryos; however, MAP was shown to be a more sensitive parameter in the present study.

In addition to a nociceptive response, it must also be considered that the measured cardiovascular changes may be induced by other factors that influence the autonomic nervous system [54] or by embryonic movements. Especially in birds, physiological variables can be influenced by many external factors, such as temperature, light, or handling [54]. A correlation between fetal movements and HR irregularities has been described in human fetuses [55]. In the present study, movements of the embryo induced minor variations in HR and DAP, but MAP was not affected. No sustained increase in MAP and HR as observed in response to *Pinch* could be attributed to movements.

Infiltration anesthesia at the base of the beak could be used to verify that the measured changes in MAP and HR may be classified as a nociceptive response and were not caused by embryonic movements or factors that influence the autonomic nervous system. The application of local anesthetics is one of the best methods to prevent the generation and transmission of nociceptive impulses [56]. These anesthetics act by blocking sodium channels in the nerve axon [54]. The application of lidocaine or bupivacaine has been described as an effective method of analgesia in birds [57]. However, the time of onset of action and the duration of action are not defined for birds [54]. In the present study, lidocaine was used because it has a rapid onset of action in mammals [56], as well as a short onset of action for spinal anesthesia in chickens [58]. Given that higher sensitivity to local anesthetics is expected in birds than in mammals [59], embryos were intensively monitored for

the occurrence of toxic effects. No signs of side effects such as bradycardia, arrhythmia or hypotension were observed in the tested embryos. Because the increase in MAP was significantly reduced by the injection of lidocaine (Figure 4), the cardiovascular reactions to *Pinch* in the embryos that did not receive local anesthesia might be interpreted as a nociceptive response to the noxious stimulus. A limitation and possible explanation for the incompletely suppressed reaction in some embryos was that injection into the beak of the moving embryo was challenging, and infiltration of the entire beak area could not always be assured. It must be mentioned that the present study was exploratory and the size of the group receiving local anesthesia was rather small. Further investigations would need to be performed to verify the effect of local anesthesia and to ultimately exclude other factors as the cause of the measured cardiovascular changes. However, assuming that it is a nociceptive response, further studies regarding anesthesia and analgesia protocols are necessary to provide improved animal welfare for chicken embryos in research. Cardiovascular variations are commonly used to determine the need for analgesia or sedatives [23], and thus far, there are no EU-wide regulations regarding anesthesia and analgesia for chicken embryos in research.

Although no significant difference between *Pinch* and *Touch* was reached at ED15 in MAP (Figure S1f) and HR (Figure S3f), individual responses could be observed. Occasionally, embryos at ED15 showed reactions in MAP (Figure S2f) and HR (Figure S4f) after *Pinch*. The measurements of these embryos were performed late in the day. The development of the embryos could therefore have been more advanced compared to embryos examined in the morning. In addition, embryonic development can be influenced by various factors, and some embryos might progress faster in development than others [39]. Therefore, it must be assumed that a nociceptive cardiovascular response is possible in individual embryos at ED15.

A limitation of the study was that intra-arterial measurement of blood pressure and HR is an invasive method. The measurements had to be performed on the fenestrated egg, making it necessary to open the egg membranes. Because chicken embryos are highly sensitive to external factors [29,42], special care was taken to maintain standardized environmental conditions and to avoid blood loss during preparation. In some embryos, severe bradycardia and hypotension were observed, or HR frequently decreased to zero. These embryos had to be excluded from the analysis because reliable measurements could not be completed. At ED7, reaching

the beak was challenging, and a measurement could only be performed in three embryos; severe arrhythmias affecting MAP were observed. The microtip catheter is designed to measure low pressures, but the measurement accuracy of 2 mmHg, according to the manufacturer, reached its limits with the occurrence of extremely low blood pressure in ED7. The results from ED7 should therefore be interpreted with caution.

7. Conclusions

In conclusion, significant differences and large effect sizes in a cardiovascular response to a mechanical noxious stimulus at the base of the beak compared with a light touch at the base of the beak were detected in chicken embryos on EDs 16 to 18. For individual embryos, cardiovascular changes after the introduction of a noxious mechanical stimulus have already been observed on ED15. MAP was found to be the most sensitive parameter in the present study, whereas variable observations were made regarding HR. Infiltration anesthesia with the local anesthetic lidocaine (2%) significantly reduced the reactions of MAP to a noxious mechanical stimulus at the base of the beak in ED18 embryos, indicating that the measured cardiovascular changes may be interpreted as nociceptive responses. However, it must be mentioned that this was an exploratory study with a correspondingly small group size. To assess response to a noxious stimulus, a multiparametric approach should be adopted and several parameters should be assessed in their entirety [60]. Thus, to properly evaluate a nociceptive response in the chicken embryo, other parameters, such as movement analysis, should be taken into account in addition to hemodynamic parameters.

8. References

1. Weissmann, A.; Reitemeier, S.; Hahn, A.; Gottschalk, J.; Einspanier, A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology* **2013**, *80*, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.014>.
2. Vinci, C. *Male Chick Culling*; European Parliamentary Research Service: Brussels, Belgium, 2022.
3. Gautron, J.; Réhault-Godbert, S.; Van de Braak, T.G.H.; Dunn, I.C. Review: What are the challenges facing the table egg industry in the next

- decades and what can be done to address them? *Animal* **2021**, *15* (Suppl. 1), 100282. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100282>.
4. Krautwald-Junghanns, M.E.; Cramer, K.; Fischer, B.; Förster, A.; Galli, R.; Kremer, F.; Mapesa, E.U.; Meissner, S.; Preisinger, R.; Preusse, G.; et al. Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 749–757. <https://doi.org/10.3382/ps/pex389>.
 5. Reithmayer, C.; Danne, M.; Mußhoff, O. Look at that!-The effect pictures have on consumer preferences for in ovo gender determination as an alternative to culling male chicks. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.092>.
 6. Seabra, R.; Bhogal, N. In vivo research using early life stage models. *In Vivo* **2010**, *24*, 457–462.
 7. Rashidi, H.; Sottile, V. The chick embryo: Hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays* **2009**, *31*, 459–465. <https://doi.org/10.1002/bies.200800168>.
 8. Aleksandrowicz, E.; Herr, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *Altex* **2015**, *32*, 143–147. <https://doi.org/10.14573/altex.1410031>.
 9. International Association for the Study of Pain (IASP). Pain Terms and Definitions. Available online: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/> (accessed on 11 April 2023).
 10. Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **2001**, *413*, 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>.
 11. Sneddon, L.U. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda)* **2018**, *33*, 63–73. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2017>.
 12. Bell, A. The neurobiology of acute pain. *Vet. J.* **2018**, *237*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>.
 13. Douglas, J.M.; Sanchez-Migallon Guzman, D.; Paul-Murphy, J.R. Pain in Birds: The Anatomical and Physiological Basis. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2018**, *21*, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.008>.
 14. Bellieni, C.V. New insights into fetal pain. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2019**, *24*, 101001. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.04.001>.

15. Bjørnstad, S.; Austdal, L.P.; Roald, B.; Glover, J.C.; Paulsen, R.E. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *355*, 386–396. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227025>.
16. Rosenbruch, M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *Altex* **1997**, *14*, 111–113.
17. Eide, A.L.; Glover, J.C. Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. *Anat. Embryol.* **1997**, *195*, 237–250. <https://doi.org/10.1007/s004290050043>.
18. Eide, A.L.; Glover, J.C. Development of the longitudinal projection patterns of lumbar primary sensory afferents in the chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* **1995**, *353*, 247–259. <https://doi.org/10.1002/cne.903530207>.
19. Mellor, D.J.; Diesch, T.J. Birth and hatching: Key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *N. Z. Vet. J.* **2007**, *55*, 51–60. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36742>.
20. Peters, J.J.; Vonderahe, A.R.; Powers, T.H. The functional chronology in developing chick nervous system. *J. Exp. Zool.* **1956**, *133*, 505–518. <https://doi.org/10.1002/jez.1401330306>.
21. Herr, K. Pain assessment strategies in older patients. *J. Pain.* **2011**, *12*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.11.011>.
22. Prunier, A.; Mounier, L.; Le Neindre, P.; Leterrier, C.; Mormède, P.; Paulmier, V.; Prunet, P.; Terlouw, C.; Guatteo, R. Identifying and monitoring pain in farm animals: A review. *Animal* **2013**, *7*, 998–1010. <https://doi.org/10.1017/s1751731112002406>.
23. Bellieni, C.V. Pain assessment in human fetus and infants. *AAPS J.* **2012**, *14*, 456–461. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9354-5>.
24. Spurlin, J., 3rd; Lwigale, P. A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for in ovo manipulations. *Dev. Dyn.* **2013**, *242*, 148–154. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23907>.
25. Phuphanin, A.; Sampanporn, L.; Sutapun, B. Smartphone-Based Device for Non-Invasive Heart-Rate Measurement of Chicken Embryos. *Sensors* **2019**, *19*, 4843. <https://doi.org/10.3390/s19224843>.
26. Aleksandrovich, A.; Nikolaevich, S.; Aleksandrovich, A.; Yakovlevich, S. Non-invasive monitoring of avian embryo heart rate. *J. Anim. Behav.*

- Biometeorol.* **2019**, *7*, 119–122. <https://doi.org/10.31893/2318-1265jabb.v7n3p119-122>.
27. Youssef, A.; Berckmans, D.; Norton, T. Non-Invasive PPG-Based System for Continuous Heart Rate Monitoring of Incubated Avian Embryo. *Sensors* **2020**, *20*, 4560. <https://doi.org/10.3390/s20164560>.
28. Acierno, M.J.; da Cunha, A.; Smith, J.; Tully, T.N.; Guzman, D.S.; Serra, V.; Mitchell, M.A. Agreement between direct and indirect blood pressure measurements obtained from anesthetized Hispaniolan Amazon parrots. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2008**, *233*, 1587–1590. <https://doi.org/10.2460/javma.233.10.1587>.
29. Girard, H. Arterial pressure in the chick embryo. *Am. J. Physiol.* **1973**, *224*, 454–460. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.224.2.454>.
30. Van Mierop, L.H.; Bertuch, C.J., Jr. Development of arterial blood pressure in the chick embryo. *Am. J. Physiol.* **1967**, *212*, 43–48. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.1.43>.
31. Tazawa, H. Measurement of blood pressure of chick embryo with an implanted needle catheter. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **1981**, *51*, 1023–1026. <https://doi.org/10.1152/jappl.1981.51.4.1023>.
32. Gentle, M.J. Pain in Birds. *Anim. Welf.* **1992**, *1*, 235–247. <https://doi.org/10.1017/S0962728600015189>.
33. Woolley, S.C.; Gentle, M.J. Physiological and behavioural responses in the hen (*Gallus domesticus*) to nociceptive stimulation. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **1987**, *88*, 27–31. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90093-4).
34. Haga, H.A.; Tevik, A.; Moerch, H. Electroencephalographic and cardiovascular indicators of nociception during isoflurane anaesthesia in pigs. *Vet. Anaesth. Analg.* **2001**, *28*, 126–131. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2987.2001.00051.x>.
35. Ruíz-López, P.; Domínguez, J.M.; Granados, M.D.M. Intraoperative nociception-antinociception monitors: A review from the veterinary perspective. *Vet. Anaesth. Analg.* **2020**, *47*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2019.09.006>.
36. Gentle, M.J.; Hunter, L.N. Physiological and behavioural responses associated with feather removal in *Gallus gallus* var *domesticus*. *Res. Vet.*

- Sci.* **1991**, *50*, 95–101. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90060-2).
37. Haga, H.A.; Dolvik, N.I. Electroencephalographic and cardiovascular variables as nociceptive indicators in isoflurane-anaesthetized horses. *Vet. Anaesth. Analg.* **2005**, *32*, 128–135. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2005.00194.x>.
38. Mueller, C.; Burggren, W.; Tazawa, H. *The Physiology of the Avian Embryo*; Denton, TX, USA, 2015; pp. 739–766.
39. Burggren, W.; Crossley, D.A., 2nd. Comparative cardiovascular development: Improving the conceptual framework. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2002**, *132*, 661–674. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00127-7).
40. Crossley, D., 2nd; Altimiras, J. Ontogeny of cholinergic and adrenergic cardiovascular regulation in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2000**, *279*, R1091–R1098. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1091>.
41. McCarty, L.P.; Shideman, F.E.; Lee, W.C. Measurement of the inotropic effects of drugs on the innervated and noninnervated embryonic chicken heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1960**, *129*, 315–321.
42. Andrewartha, S.J.; Tazawa, H.; Burggren, W.W. Embryonic control of heart rate: Examining developmental patterns and temperature and oxygenation influences using embryonic avian models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2011**, *178*, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.04.014>.
43. Gentle, M.J. Pain issues in poultry. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2011**, *135*, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.023>.
44. Dubbeldam, J.L. The sensory trigeminal system in birds: Input, organization and effects of peripheral damage. A review. *Arch. Physiol. Biochem.* **1998**, *106*, 338–345. <https://doi.org/10.1076/apab.106.5.338.4367>.
45. Kuenzel, W.J. Neurobiological basis of sensory perception: Welfare implications of beak trimming. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 1273–1282. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1273>.
46. Chumak, V.I. Dinamika Reflektomykh Reaktsii i Vkluchenie Retseptornykh Apparatov u Embriona Kuritsy (Dynamics of Reflex Reactions and Initiation of Receptor Systems in the Chick Embryo). In *Sbornik, (publisher) Voprosy Fiziologii i Patologii Tsentral'noi Nervnoi*

- Sistemy Cheloveka i Zhivotnykli v Ontogeneze*; Moskva, UdSSR, 1961, pp. 63–68.
47. Chiba, Y.; Fukuoka, S.; Niiya, A.; Akiyama, R.; Tazawa, H. Development of cholinergic chronotropic control in chick (*Gallus gallus domesticus*) embryos. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2004**, *137*, 65–73. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(03\)00271-x](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(03)00271-x).
48. Akiyama, R.; Matsuhisa, A.; Pearson, J.T.; Tazawa, H. Long-term measurement of heart rate in chicken eggs. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **1999**, *124*, 483–490. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00141-5](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00141-5).
49. Moriya, K.; Höchel, J.; Pearson, J.T.; Tazawa, H. Cardiac rhythms in developing chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **1999**, *124*, 461–468. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00138-5](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00138-5).
50. Höchel, J.; Akiyama, R.; Masuko, T.; Pearson, J.T.; Nichelmann, M.; Tazawa, H. Development of heart rate irregularities in chick embryos. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, H527–H533. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.2.H527>.
51. Lehmann, H.S.; Musk, G.C.; Laurence, M.; Hyndman, T.H.; Tuke, J.; Collins, T.; Gleerup, K.B.; Johnson, C.B. Mitigation of electroencephalographic and cardiovascular responses to castration in *Bos indicus* bulls following the administration of either lidocaine or meloxicam. *Vet. Anaesth. Analg.* **2017**, *44*, 1341–1352. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2017.04.009>.
52. Saller, A.M.; Werner, J.; Reiser, J.; Senf, S.; Deffner, P.; Abendschön, N.; Weiß, C.; Fischer, J.; Schörwerth, A.; Miller, R.; et al. Local anesthesia in piglets undergoing castration-A comparative study to investigate the analgesic effects of four local anesthetics on the basis of acute physiological responses and limb movements. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236742>.
53. van Lieshout, J.J.; Wieling, W.; Karemaker, J.M.; Eckberg, D.L. The vasovagal response. *Clin. Sci.* **1991**, *81*, 575–586. <https://doi.org/10.1042/cs0810575>.
54. Paul-Murphy, J.; Ludders, J.W. Avian analgesia. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2001**, *4*, 35–45, vi. [https://doi.org/10.1016/s1094-9194\(17\)30049-x](https://doi.org/10.1016/s1094-9194(17)30049-x).

55. Aladjem, S.; Rest, J.; Stojanovic, J. Fetal heart rate responses to fetal movements. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **1977**, *84*, 487–491. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1977.tb12630.x>.
56. Lascelles, B.D.X.; Kirkby Shaw, K. An extended release local anaesthetic: Potential for future use in veterinary surgical patients? *Vet. Med. Sci.* **2016**, *2*, 229–238. <https://doi.org/10.1002/vms3.43>.
57. Machin, K. Controlling Avian Pain. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. N. Am. Ed.* **2005**, *27*, 299–309.
58. Khamisabadi, A.; Kazemi-Darabadi, S.; Akbari, G. Comparison of Anesthetic Efficacy of Lidocaine and Bupivacaine in Spinal Anesthesia in Chickens. *J. Avian Med. Surg.* **2021**, *35*, 60–67. <https://doi.org/10.1647/1082-6742-35.1.60>.
59. Machin, K. Avian Analgesia. *Semin. Avian Exot. Pet. Med.* **2005**, *14*, 236–242. <https://doi.org/10.1053/j.saep.2005.09.004>.
60. Sneddon, L.U.; Elwood, R.W.; Adamo, S.A.; Leach, M.C. Defining and assessing animal pain. *Anim. Behav.* **2014**, *97*, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.09.007>.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1. Figure S1: Percent change in MAP post *Touch* and *Pinch*. Figure S2: Percent change from the baseline mean value in MAP over time. Figure S3: Percent change in HR post *Touch* and *Pinch*. Figure S4: Percent change from the baseline mean value in HR over time. Table S1: Statistical metrics.

9. S1 Appendix

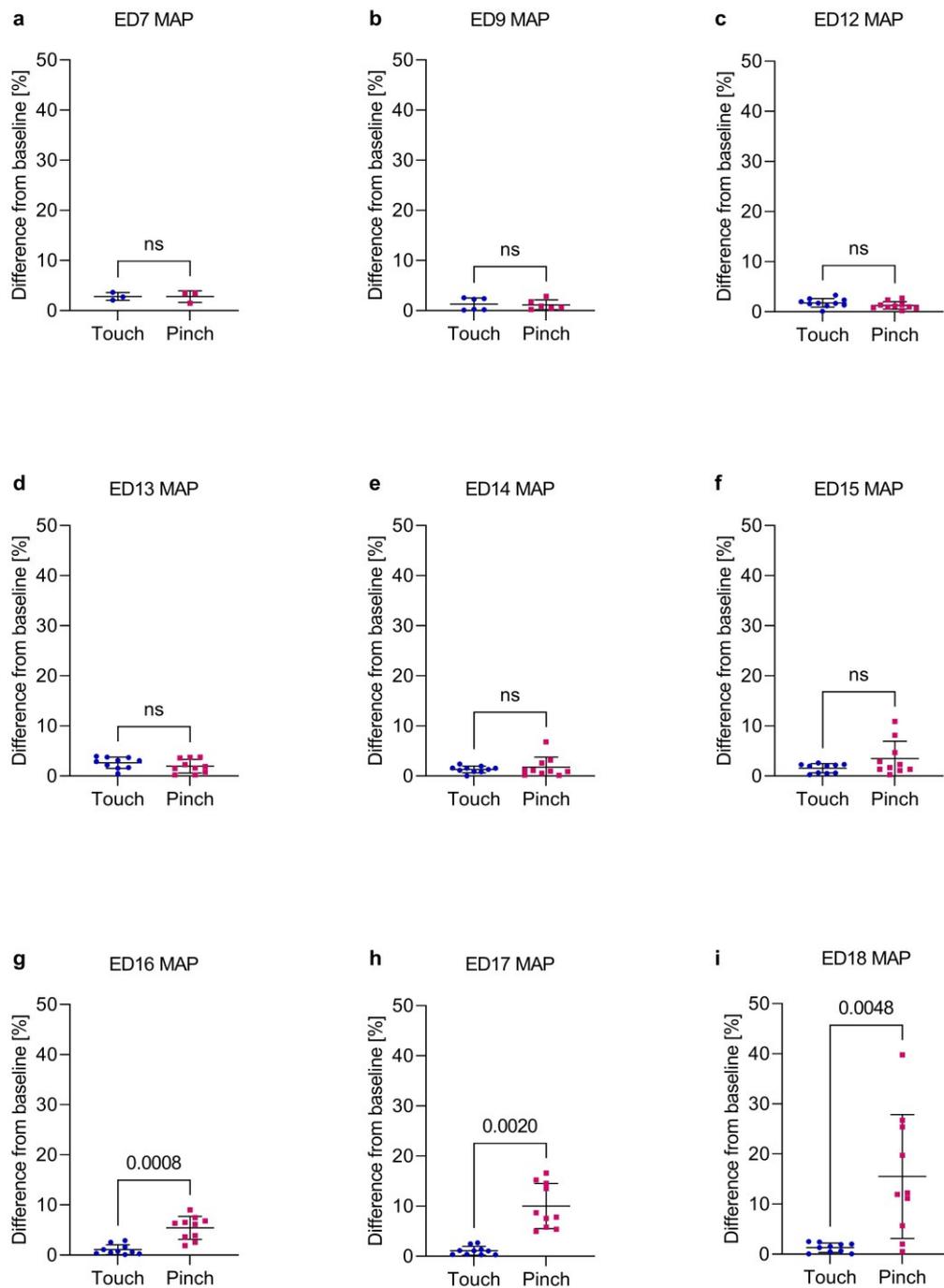


Figure S1. Percent change in MAP post Touch and Pinch. a-i Embryos at embryonic day (ED) 7 (n=3), ED9 (n=6) and EDs 12 to 18 (n=10) received a mechanical noxious stimulus (Pinch) and a light touch as control (Touch) at the base of the beak in randomized order. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t-test (normally distributed: c, d, g and i) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: a, b, e, f and h). Mean and p values shown; g: $p=0.0008$, h: $p=0.0020$ and i: $p=0.0048$; ns = no significant difference between the groups.

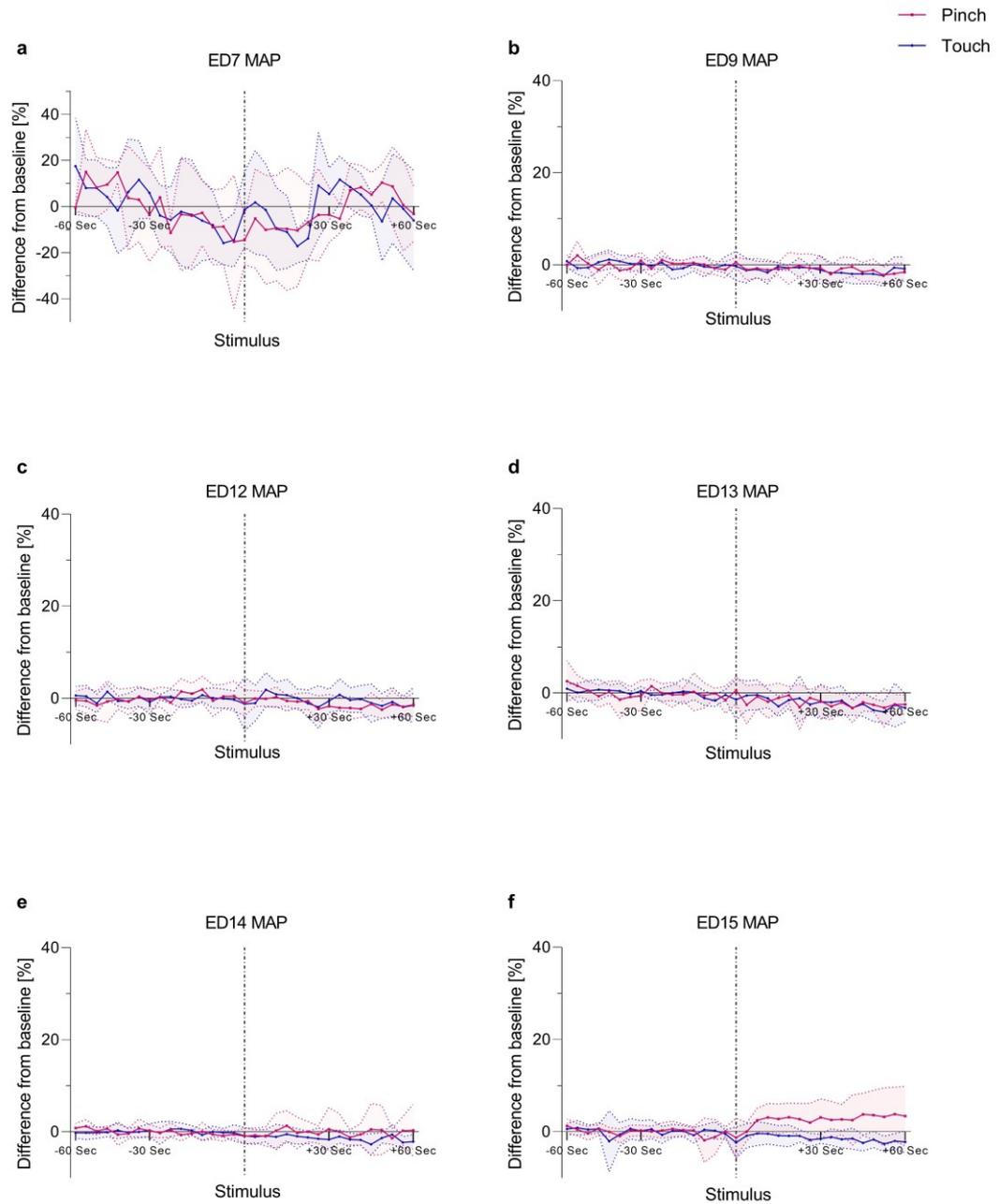


Figure S2. Percent change from the baseline mean value in MAP over time. a-f Embryos at ED7 (n=3), ED9 (n=6) and EDs 12 to 15 (n=10) received a mechanical noxious stimulus (*Pinch*) and a light touch as control (*Touch*) at the base of the beak in randomized order. Values were recorded every four seconds for one minute before and after stimulation (*Touch* and *Pinch*). Values are shown as the mean \pm standard deviation (shaded).

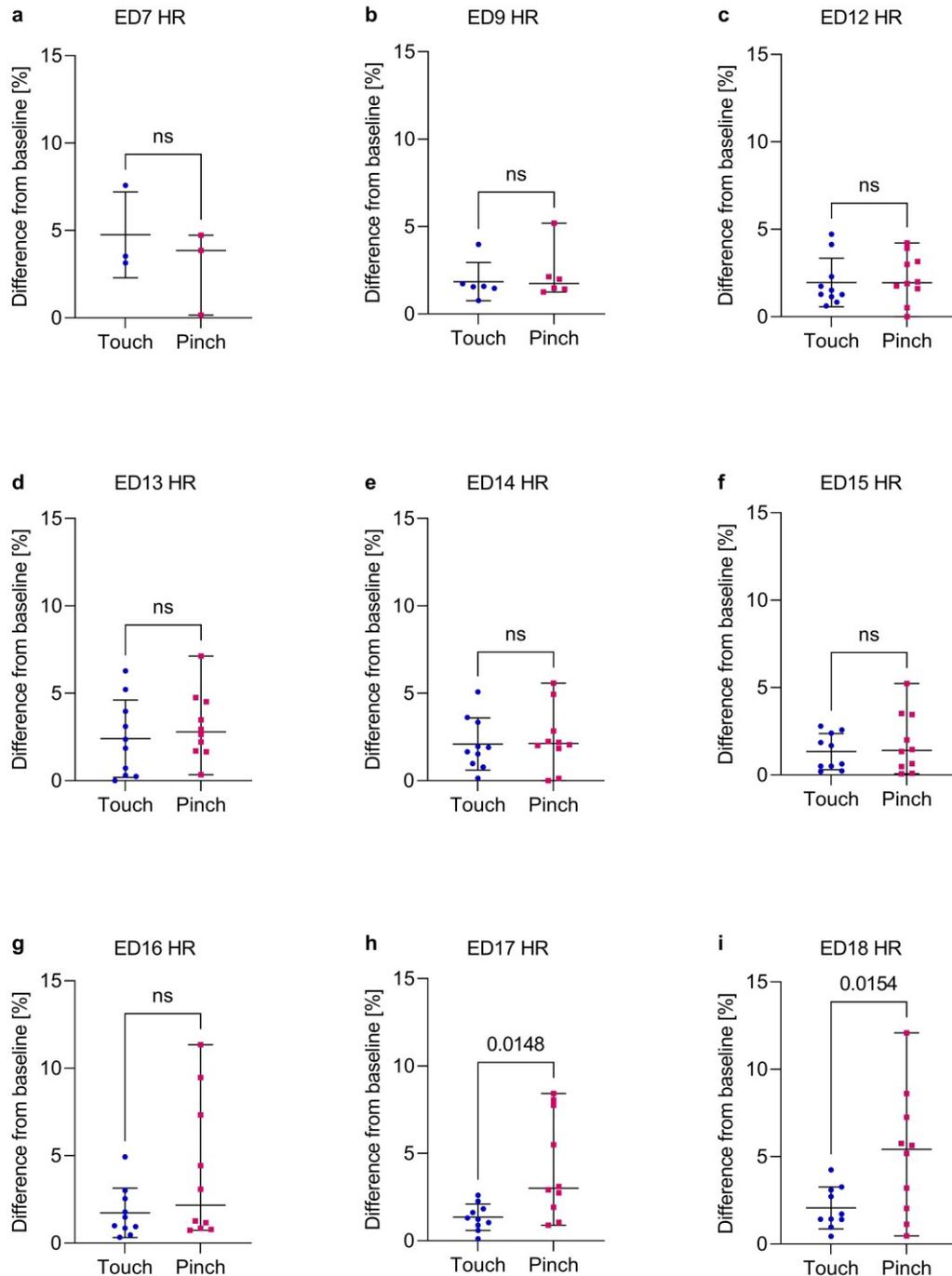


Figure S3. Figure S3. Percent change in HR post *Touch* and *Pinch*. a-i Embryos at ED7 (n=3), ED9 (n=6) and EDs 12 to 18 (n=10) received a mechanical noxious stimulus (*Pinch*) and a light touch as control (*Touch*) at the base of the beak in randomized order. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t-test (normally distributed: a, d-f, h and i) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: b, c and g). Mean and *p* values shown; h: $p=0.0148$ and i: $p=0.0154$; ns = no significant difference between the groups.

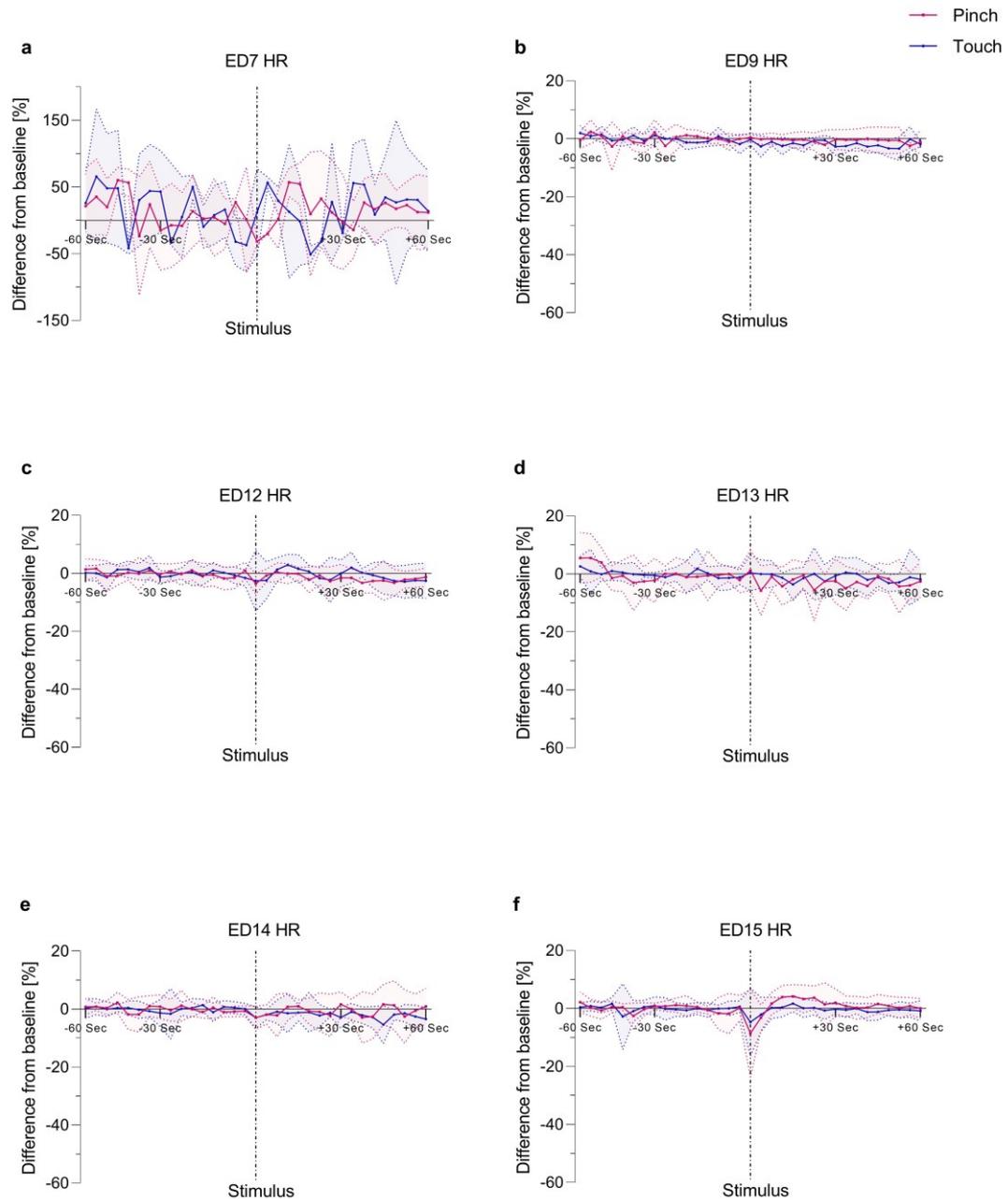


Figure S4. Percent change from the baseline mean value in HR over time. a-f Embryos at ED7 (n=3), ED9 (n=6) and EDs 12 to 15 (n=10) received a mechanical noxious stimulus (*Pinch*) and a light touch as control (*Touch*) at the base of the beak in randomized order. Values were recorded every four seconds for one minute before and after stimulation (*Touch* and *Pinch*). Values are shown as the mean \pm standard deviation (shaded).

Table S1. Statistical Metrics.

Paired t-test (two-tailed)	MAP				HR					
ED	18	16	13	12	18	17	15	14	13	7
Figure	2c	2a	S1d	S1c	3c	3b	S3f	S3e	S3d	S3a
number of samples	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3
Mean difference	14.212	4.351	-0.674	-0.524	3.068	2.888	0.494	0.288	0.734	-1.834
SD of differences	12.088	2.763	1.811	1,132	3.254	3.036	2.038	1.712	2.307	4.875
SEM of differences	3.823	0.874	0.573	0.358	1.029	0.960	0.645	0.541	0.730	2.814
<i>p</i> -value	0.0048	0.0008	0.2692	0.1775	0.0154	0.0148	0.4631	0.6071	0.3408	0.5815
<i>t</i> -value	3.718	4.980	1.178	1.463	2.981	3.008	0.7663	0.5328	1.006	0.6516
degrees of freedom <i>df</i>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	2
95 % CI lower	5.564	2.375	-1.970	-1.334	0.7397	0.7160	-0.9641	-0.9361	-0.9166	-13.94
95 % CI upper	22.86	6.328	0.6212	0.2862	5.396	5.059	1.952	1.513	2.384	10.28
effect size (Cohen's <i>d</i> pooled variance)	1.622	2.464	0.539	0.645	1.144	1.343	0.347	0.176	0.353	0.751
effect size <i>r</i>	0.778	0.857	0.365	0.438	0.705	0.708	0.248	0.175	0.318	0.418
Wilcoxon signed-rank test (two-tailed)	MAP				HR					
ED	17	15	14	9	7	16	12	9		
Figure	2b	S1f	S1e	S1b	S1a	3a	S3c	S3b		
number of samples	10	10	10	6	3	10	10	6		
Median of differences	7.117	1.204	-0.4764	-0.03964	-0.1774	1.457	0.2806	0.5080		
<i>p</i> -value	0.0020	0.1934	0.6953	>0.9999	>0.9999	0.1309	0.3223	0.1563		
<i>z</i> -score	2.803	1.376	0.459	0.105	0.000	1.580	1.070	1.572		

V. ERWEITERTE STUDIENERGEBNISSE – NEUROHUMORALE PARAMETER

DOPA wurde von ED 15 bis 18 sowohl in der Versuchs- als auch der Kontrollgruppe detektiert und quantifiziert. NE war detektierbar, jedoch war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in vielen Proben zu gering, um Konzentrationen quantifizieren zu können. E wurde in keiner der Proben detektiert.

Es konnte keine Veränderung der Konzentration von DOPA als Reaktion auf *Pinch* im Vergleich zu *Touch* beobachtet werden. Die Baseline-Konzentrationen von DOPA und NE waren meistens höher als an den Zeitpunkten T1 bis T3. Die von ED 15 bis 18 gemessenen Konzentrationen von DOPA sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Konzentrationen von DOPA in ng/l aus der Allantois-/Amnionflüssigkeit von ED 15 bis 18 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.

ED	ED 15		ED 16		ED 17		ED 18	
Dopamin [ng/l]	<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

VI. ERWEITERTER DISKUSSIONSTEIL

1. Einfluss von Arrhythmien auf die Auswertung kardiovaskulärer Parameter

In der vorliegenden Studie waren mit zunehmendem Alter der Embryonen spontane Unregelmäßigkeiten in der HR zu beobachten. Über den gesamten Messzeitraum wurden vor allem kurze Dezelerationen der HR beobachtet, während der MAP nicht beeinflusst wurde. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Fluktuationen der HR am Ende der zweiten Inkubationswoche auftreten (AKIYAMA et al., 1999; MORIYA et al., 1999; CHIBA et al., 2004). Es wird diesbezüglich von der momentanen HR gesprochen, die auf Veränderungen der Frequenz von Schlag zu Schlag beruht (MUELLER et al., 2015) (siehe hierzu auch Kapitel II.2.3.1)

Die vorliegenden Beobachtungen korrelieren am besten mit dem in der Literatur als *V*-Muster beschriebenen Phänomen, das als schnelle Dezeleration der HR mit anschließender langsamer Erholung zum Ausgangswert definiert ist (HÖCHEL et al., 1998). Das *V*-Muster wurde von HÖCHEL et al. (1998) bei Embryonen ab dem 14. Inkubationstag beobachtet. Der Literatur zufolge hängen diese Dezelerationen der HR mit dem Beginn der parasympathischen Innervation zusammen und werden durch den vagalen Tonus vermittelt, der um den 12. Inkubationstag funktionsfähig ist (PAPPANO & LÖFFELHOLZ, 1974; HÖCHEL et al., 1998; CHIBA et al., 2004). Über den Einsatz des vagalen Tonus gibt es jedoch Kontroversen und es wird angenommen, dass die Entwicklung des autonomen Herz-Kreislauf-Systems je nach Hühnerrasse unterschiedlich verläuft (CROSSLEY & ALTIMIRAS, 2000; CHIBA et al., 2004). CROSSLEY et al. (2003) beschreiben in ihrer Arbeit, dass bei Hühnerembryonen der Rasse „White Leghorn“ bis zum Schlupf kein vagaler Tonus auf das kardiovaskuläre System einwirkt, wohingegen bei Bantam-Hühnern ein vagaler Tonus in der Embryonalentwicklung festzustellen ist. CHIBA et al. (2004) haben bei Broilern Fluktuationen der momentanen HR ab dem 12. Inkubationstag festgestellt. Ab dem 13. Inkubationstag konnten sie auch signifikante Unterschiede der mittleren HR vor und nach der Applikation von Atropin beobachten (CHIBA et al., 2004).

Außerdem waren Unregelmäßigkeiten der HR in der vorliegenden Studie häufig mit Bewegungen des Embryos verbunden, insbesondere mit zunehmendem

Embryonalalter. Eine Korrelation zwischen fötalen Bewegungen und Fluktuationen der HR ist bei humanen Föten beschrieben (ALADJEM et al., 1977; HÖCHEL et al., 1998). Bei den älteren Embryonen könnte ein Grund auch sein, dass eine geringgradige Beeinflussung des katheterisierten Gefäßes aufgrund der Größe des Embryos unvermeidbar war. Parallel zu den Bewegungen des Embryos und den Fluktuationen der HR wurden auch geringgradige Unregelmäßigkeiten im DAP beobachtet, während der MAP jedoch nicht beeinflusst wurde.

Im Gegensatz zu den beobachteten Fluktuationen der momentanen HR konnte ein unmittelbarer Abfall der HR nach *Pinch* an ED 17 und 18 festgestellt werden (siehe auch Kapitel IV). Die HR sank nach dem *Pinch* stärker und über einen längeren Zeitraum. An ED 17 und 18 dauerte der Abfall der HR bis zu 20 s und sank um bis zu -50 % gegenüber dem Ausgangswert, während für das *V*-Muster eine Erholung zurück zum Ausgangswert innerhalb von weniger als 10 s beschrieben wird (HÖCHEL et al., 1998). Der Abfall der HR nach dem *Pinch* ging auch mit einem leichten Abfall des MAP einher. Ein Abfall der HR wurde nach dem *Touch* sowie bei jüngeren Embryonen nicht beobachtet. Es zeigten jedoch nicht alle Embryonen an ED 17 und 18 diese Reaktion. In Studien bei Säugetieren wurde als Reaktion auf einen noxischen Reiz auch ein Abfall von HR und Blutdruck beobachtet (LEHMANN et al., 2017; SALLER et al., 2020). In der Literatur ist beschrieben, dass dieser möglicherweise auf einen vasovagalen Reflex im Zusammenhang mit dem noxischen Reiz zurückgeführt werden kann (VAN LIESHOUT et al., 1991). Jedoch kann die beobachtete Reaktion der HR nicht eindeutig als nozizeptive Reaktion definiert werden. Der Abfall der HR könnte auch eine Kompensation des signifikanten Anstiegs im MAP nach *Pinch* durch den Baroreflex sein. Dieser Kompensationsmechanismus, der in Kapitel II.2.2.1 beschrieben wurde, ist ab 80 % der Inkubationszeit aktiv (ALTIMIRAS & CROSSLEY, 2000; ELFWING et al., 2011). Folglich würde das Einsetzen des Baroreflexes den beobachteten Abfall der HR an ED 17 und 18 erklären. An ED 16 ist der Baroreflex wahrscheinlich noch nicht aktiv, sodass kein HR-Abfall trotz signifikantem Anstieg im MAP nach *Pinch* stattfindet. Erst ab 90 % der Inkubationszeit wird die Sensitivität des Baroreflexes durch Angiotensin II herabgesetzt (MUELLER et al., 2015). Um die Ursache des Abfalls der HR nach *Pinch* näher einzugrenzen, müssten folglich Messungen an ED 19 und eventuell ED 20 durchgeführt werden. Ist der Abfall der HR Ursache des Baroreflexes müsste dieser dann ausbleiben oder weniger stark auftreten. Ist der

Abfall der HR eine nozizeptive Reaktion wäre ein stärkeres Auftreten nach *Pinch* an ED 19 und 20 zu erwarten.

Die vorliegende Studie legt nahe, dass Reaktionen der HR nach *Pinch* nicht eindeutig einer nozizeptiven Reaktion zugeordnet werden können. Zudem wurde bei älteren Embryonen die mittlere HR durch Arrhythmien beeinflusst. Die HR ist beim Hühnerembryo folglich kein verlässlicher Parameter zur Beurteilung einer nozizeptiven Reaktion. Im Gegensatz dazu wurde die Auswertung des MAP nicht durch Fluktuationen der HR und Bewegungen des Embryos beeinflusst. Außerdem wurden im MAP deutlichere Reaktionen auf *Pinch* festgestellt als in der HR. Der MAP wurde in der vorliegenden Studie daher als primärer Parameter zur Beurteilung einer nozizeptiven Reaktion beim Hühnerembryo verwendet (siehe auch Kapitel IV).

2. Neurohumorale Parameter als Indikatoren für Nozizeption beim Hühnerembryo

In der vorliegenden Studie konnten Dopamin (DOPA) und Norepinephrin (NE), jedoch nicht Epinephrin (E) in der Allantois-/Amnionflüssigkeit mittels Massenspektrometrie gemessen werden. Quantifizierbare Konzentrationen konnten jedoch nur für DOPA detektiert werden, bei NE war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den meisten Proben zu gering für eine Quantifizierung. Eine Evaluierung der Katecholamine in der Allantois-/Amnionflüssigkeit beim Hühnerembryo konnte folglich nur für DOPA erfolgen (siehe Kapitel V). Auch EPPLÉ et al. (1992) haben sowohl in Allantois- als auch Amnionflüssigkeit größere Konzentrationen von DOPA gemessen als von NE und E. EPPLÉ et al. (1992) haben hierfür eine radioenzymatische Technik verwendet. Andere Forscher haben zur Bestimmung von Katecholaminkonzentrationen eine HPLC durchgeführt (GILL et al., 1994; MULDER et al., 2000). In der vorliegenden Studie wurde zur Detektion der Katecholamine jedoch eine Massenspektrometrie gewählt, da diese in der Proteomik aktuell die Technik mit der größten Sensitivität und Spezifität darstellt (MANN et al., 2001; DE JONG et al., 2010). Bei der Massenspektrometrie werden die Massen verschiedener Proteine und Peptide durch Messung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ihrer Ionen in der Gasphase bestimmt. Somit kann eine Vielzahl von Molekülen differenziert werden (MANN et al., 2001; DE JONG et al., 2010). In der Humanmedizin wird diese Methode regelmäßig zur Bestimmung von DOPA, NE und E in Blutplasma oder Urinproben verwendet. Das Ziel ist in den meisten Fällen die Diagnose von Katecholamin-produzierenden Tumoren (DE JONG et al., 2010). Bei Hühnerembryonen sind bisher keine Daten für die Messung von Katecholaminen mit Hilfe einer Massenspektrometrie publiziert.

Für die Durchführung der Massenspektrometrie wurden in der vorliegenden Studie 250 µl Probenvolumen benötigt. Eine mehrmalige Blutentnahme dieses Volumens bei einem Hühnerembryo erwies sich als nicht möglich. Bei einem Gesamtblutvolumen von ca. 3 ml an ED 18 entspricht eine einmalige Entnahme des benötigten Volumens bereits ungefähr 8 % des Gesamtblutvolumens des Embryos (MUELLER et al., 2015). Bei einer mehrmaligen Blutentnahme kann zudem eine Stressreaktion aufgrund der Entnahmetechnik und des Blutverlustes nicht ausgeschlossen werden (EPPLÉ et al., 1992). Die Verwendung von einzelnen Embryonen für die gewünschten Probennahmezeitpunkte hätte eine sehr große

Tierzahl zur Folge, weshalb aufgrund von Tierschutzgründen darauf verzichtet wurde. Die Entnahme von Allantois-/Amnionflüssigkeit stellt eine weniger invasive Methode dar. Das Volumen der beiden Flüssigkeiten ist im untersuchten Entwicklungszeitraum ausreichend groß, sodass eine mehrmalige zügige Probenentnahme bei einem Embryo an den untersuchten Zeitpunkten möglich war. Zudem konnte von EPPLE et al. (1992) keine Stressreaktion auf den Verlust von Allantoisflüssigkeit zurückgeführt werden. Nach einem Stressor werden Katecholamine nach dem unmittelbaren Anstieg im Blutplasma innerhalb weniger Minuten in die Allantois abgegeben (EPPLE et al., 1992).

In der vorliegenden Studie ist bei der Evaluation der Baseline-Werte von DOPA erkennbar, dass die Konzentration in der Allantois-/Amnionflüssigkeit von ED 15 bis 18 tendenziell ansteigt. Ein Anstieg von zirkulierenden Katecholaminen mit zunehmendem Embryonalalter wurde auch in anderen Studien festgestellt (BOUCEK & BOURNE, 1962; EPPLE et al., 1992; MULDER et al., 2000; VON BLUMRÖDER & TÖNHARDT, 2002). Nach dem noxischen Stimulus konnte jedoch keine Reaktion der Konzentration von DOPA im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt die Probenentnahmetechnik dar. In bisherigen Studien, hauptsächlich von EPPLE et al. (1992), wurde bereits intensiv die Reaktion der Katecholamine auf nicht-noxische Stressoren wie Asphyxie, Hypothermie oder Hyperthermie untersucht. Zur Beurteilung einer nozizeptiven Reaktion musste in der vorliegenden Studie jedoch ein noxischer Reiz am Embryo ausgeübt werden, was mit einer direkten Manipulation des Embryos einhergeht. Um den in Kapitel III.2 beschriebenen mechanischen noxischen Stimulus an der Schnabelbasis zu applizieren, musste zusätzlich zur Allantois auch das Amnion eröffnet werden, das den Embryo unmittelbar umgibt (DA SILVA et al., 2017). Folglich war eine Vermischung von Allantois- und Amnionflüssigkeit nicht vermeidbar. Der Grad der Vermischung war jedoch nicht beeinflussbar. Somit war eine Standardisierung des Probenmaterials erschwert. Durch die Bewegungen des Embryos wurde die Vermischung der Flüssigkeiten möglicherweise mit voranschreitender Zeit stärker. Da die Katecholaminkonzentrationen im Amnion im Vergleich zur Allantois deutlich niedriger sind (EPPLE et al., 1992; EPPLE et al., 1997), ist eine Beurteilung der gemessenen Konzentrationen aus der gemischten Allantois-/Amnionflüssigkeit schwierig.

Des Weiteren ist am Verlauf der DOPA-Konzentration über die Zeit zu beobachten, dass die Baseline-Werte in der Regel am höchsten waren. Mit voranschreitender Zeit bis T3 war sowohl nach dem noxischen Reiz als auch der Kontrolle tendenziell ein Abfall der DOPA-Konzentration festzustellen. Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise eine bereits auf die Manipulation des Eis und Entnahmetechnik erfolgte stressbedingte Ausschüttung von Katecholaminen. Katecholamine werden als erste Reaktion auf Stressoren freigesetzt (CARSIA, 2022). Insbesondere bei Vögeln können externe Faktoren wie Licht, Geräusche und Handling bereits akute Stressoren darstellen und eine Veränderung physiologischer Variablen zur Folge haben (PAUL-MURPHY & LUDDERS, 2001). Somit kann die Probennahmetechnik selbst bereits eine Stressreaktion auslösen (HENKE, 2012b). Bei Hühnerembryonen haben EPPLÉ et al. (1992) erhöhte Konzentrationen von DOPA, NE und E bereits nach der Manipulation des Eis für die Entnahme von Allantoisflüssigkeit beobachtet. Ähnlich zu dem Vorgehen von EPPLÉ et al. (1992) wurde in der vorliegenden Studie die Öffnung der Eischale erweitert sowie Allantois und Amnion eröffnet um gemischte Allantois-/Amnionflüssigkeit zu entnehmen. Zudem wurde das Ei zuvor in die Wärmekammer verbracht, um die Experimente unter größtmöglich standardisierten Bedingungen durchzuführen (siehe Kapitel III.1). Da es nach einem Stressor bei Hühnerembryonen zu einem unmittelbaren Anstieg der Katecholaminkonzentrationen im Blutplasma, gefolgt von einem Konzentrationsanstieg in der Allantois innerhalb von wenigen Minuten kommt (EPPLÉ et al., 1992), sind die hohen Baseline-Werte von DOPA möglicherweise auf eine Stressreaktion aufgrund der Manipulation des Eis zurückzuführen. Trotz größtmöglicher Standardisierung der Umweltbedingungen in dem vorliegenden Versuchssetup, liegt nahe, dass unvermeidbare Faktoren wie die Verbringung des Eis in die Wärmekammer, der Einfall von Licht und die Probennahme aus der Allantois-/Amnionflüssigkeit bereits akute Stressoren für den Hühnerembryo darstellen und zu einer stressbedingten Ausschüttung von Katecholaminen führen. Anschließend bleibt eine Reaktion der Katecholamine auf den noxischen Reiz möglicherweise aus, da es bereits zur Erschöpfung des sympathischen Nervensystems gekommen ist (WIESE, 2015) oder die beschriebenen Stressoren zu einer Stress-induzierten Analgesie führen (GENTLE et al., 1989) (siehe Kapitel II.1.3).

Mit dem in dieser Studie etablierten Versuchssetup konnte bei Hühnerembryonen

folglich keine akute Reaktion auf einen noxischen Stimulus über die Zeit dargestellt werden. Die Detektion der Katecholaminkonzentrationen mit der verwendeten Technik stellte sich zur Evaluation einer nozizeptiven Reaktion beim Hühnerembryo als nicht geeignet heraus. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Studie auf eine Verfolgung dieses Versuchsansatzes verzichtet.

3. Limitationen der Studie

Da bisher keine Daten zur Untersuchung einer Reaktion hämodynamischer Parameter auf einen mechanischen noxischen Stimulus bei Hühnerembryonen publiziert wurden, war die vorliegende Studie als explorative Studie angelegt und es wurde folglich keine statistische Fallzahlberechnung durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse und aus Tierschutzgründen wurde auf höhere Tierzahlen verzichtet. Die Ergebnisse der Studie zeigen deutlich, dass ab ED 16 eine signifikante Reaktion des Hauptparameters MAP nach dem noxischen Reiz im Vergleich zur Kontrolle auftritt. Durch die Applikation von Lidocain konnte der Anstieg des MAP nach dem noxischen Reiz bei Embryonen an ED 18 signifikant reduziert werden. Folglich können die gemessenen Reaktionen nach dem noxischen Reiz als nozizeptive Reaktionen interpretiert werden.

Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Reaktionen durch andere externe Faktoren ausgelöst wurden. Die Umweltbedingungen wurden in der vorliegenden Studie hochstandardisiert, um eine Beeinflussung der Experimente durch externe Faktoren auf ein Minimum zu beschränken. Die Erfassung physiologischer Parameter liefert hilfreiche Daten bei der Beurteilung nozizeptiver Reaktionen. Ähnliche Veränderungen können jedoch auch durch nicht-noxische Stressoren, die das autonome Nervensystem beeinflussen, ausgelöst werden (ZIMMERMAN, 1986; HELLYER et al., 2007; PRICE & NOLAN, 2007; HENKE, 2012b). Da Hühnerembryonen sehr sensitiv auf externe Faktoren reagieren, können für die Durchführung der Experimente unvermeidbare Faktoren wie Licht und die Manipulation des Embryos bereits akute Stressoren darstellen (GIRARD, 1973; ANDREWARTHA et al., 2011). Auch die intraarterielle Implantation des Katheters zur Erfassung von Blutdruck und HR stellt eine invasive Messmethode dar. Die direkte intraarterielle Messung wird jedoch als Goldstandard für die Erfassung von Blutdruckwerten angesehen (ACIERNO et al., 2008). Um eine Reaktion nach einem noxischen Stimulus bestmöglich zu beurteilen, sollte ein multiparametrischer Ansatz gewählt werden und mehrere Parameter in der Gesamtheit beurteilt werden (SNEDDON et al., 2014). Folglich wurden neben der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studie Verhaltensbeobachtungen durchgeführt, die zu vergleichbaren Ergebnissen führten (SÜß et al., 2023), sowie die elektrische Hirnaktivität aufgezeichnet (KOLLMANSPERGER et al., 2023).

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann jedoch nur die Nozizeption beurteilt werden. Eine direkte Messung von Schmerzen ist beim Hühnerembryo nicht möglich. Durch die Beobachtung von Reaktionen nach noxischen Reizen können nur indirekte Rückschlüsse auf potenzielle Schmerzen geschlossen werden (XIE, 2011). Da wie in Kapitel II.1.4 beschrieben selbst in der Humanmedizin das Einsetzen der Schmerzperzeption beim Fötus bis heute intensiv diskutiert wird, ist dieses Thema auch bei Hühnerembryonen schwierig zu adressieren. Auch wenn keine Aussage über das Vorhandensein von Schmerzen getroffen werden kann, sollte das Vorliegen einer nozizeptiven hämodynamischen Reaktion ernst genommen werden. Wie in Kapitel II.1.4 beschrieben zeigt die aktuelle Evidenz aus der Schmerzforschung, dass noxische Stimuli beim Embryo die bereits ausgebildeten Nozizeptoren und Schmerzbahnen aktivieren und damit die Schmerzwahrnehmung im späteren adulten Leben beeinflussen können (THILL, 2023). Veränderungen von Blutdruck und HR werden zudem auch unter Anästhesie als Methode der Wahl zur Bestimmung des Analgetikabedarfs angesehen (RUÍZ-LÓPEZ et al., 2020).

4. Ausblick

In der vorliegenden Studie konnten neue Methoden zur Messung kardiovaskulärer Parameter bei Hühnerembryonen etabliert werden. Zudem konnte die Erhebung von kardiovaskulären Parametern zur klinischen Evaluation von nozizeptiven Reaktionen für den Hühnerembryo bestätigt und damit neue Erkenntnisse zur Beurteilung der Nozizeption bei Hühnerembryonen gewonnen werden. Besonders der MAP stellt einen sensitiven Parameter zur Beurteilung von Reaktionen auf einen mechanischen noxischen Reiz an der Schnabelbasis bei Hühnerembryonen dar. Zusammen mit den Verhaltensbeobachtungen (SÜß et al., 2023) und EEG-Aufnahmen (KOLLMANSPERGER et al., 2023), die auch im Rahmen des vom BMEL beauftragten Forschungsprojektes durchgeführt wurden, konnte die bestehende wissenschaftliche Datenlage zu Nozizeption und Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen umfangreich ergänzt werden.

Der ursprüngliche Entwurf zur Änderung des TierSchG hatte ein Verbot des Tötens von Hühnerembryonen im Zusammenhang mit der Geschlechtsbestimmung im Ei ab dem 7. Bruttag vorgesehen. Dieser Entwurf wurde basierend auf der bis dato lückenhaften Datenlage verfasst. Auf Grundlage dieser konnte Nozizeption und Schmerzempfinden vor dem 7. Inkubationstag mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, darüber hinaus konnte allerdings keine Aussage zum Einsetzen von Nozizeption und Schmerzempfinden getroffen werden (ALEKSANDROWICZ & HERR, 2015; BJØRNSTAD et al., 2015). Die Ergebnisse des beschriebenen Forschungsprojektes dienen dem BMEL als wissenschaftliche Entscheidungshilfe. Folglich wurde aufgrund der neuen Erkenntnisse der Gesetzesentwurf angepasst. Da bis einschließlich ED 12 keine elektrische Hirnaktivität gemessen wurde, erscheint ein Schmerzempfinden vor ED 13 höchst unwahrscheinlich. Von ED 13 bis 19 wurde dann eine physiologische elektrische Hirnaktivität festgestellt, sodass die Fähigkeit zur Verarbeitung eines noxischen Reizes im Gehirn potenziell möglich erscheint (KOLLMANSPERGER et al., 2023). Folglich ist seit Januar 2024 das Töten von Hühnerembryonen im Rahmen der Geschlechtsbestimmung im Ei ab dem 13. Bruttag verboten (§ 4c Abs. 3 TierSchG). Methoden zur *in ovo* Geschlechtsbestimmung können somit bis einschließlich Bruttag 12 kommerziell angewendet werden.

Die vorliegende Studie, ergänzt durch die Untersuchungen zum Verhalten von Hühnerembryonen (SÜß et al., 2023), legt zudem nahe, dass die Fähigkeit zur

Nozizeption an ED 15 nicht ausgeschlossen und ab ED 16 angenommen werden kann. Da die Beurteilung von Veränderungen hämodynamischer Parameter in der Tiermedizin eine gängige Methode zur Ermittlung des Analgetikabedarfs darstellt (RUÍZ-LÓPEZ et al., 2020), sind diese Erkenntnisse zu beachten, wenn Eingriffe und Behandlungen an Hühnerembryonen durchgeführt werden. Derzeit gelten Eingriffe zu Versuchszwecken bei Hühnerembryonen in der EU nicht als Tierversuch, sondern werden als „Replacement“-Methode angesehen (Richtlinie 2010/63/EU). Folglich gelten für Hühnerembryonen keine Vorschriften zur Minimierung von Schmerzen, Leiden und Schäden während eines Versuchs, solange es nicht zum Schlupf der Tiere kommt. Säugetierföten ab dem letzten Drittel ihrer normalen Entwicklung sowie Larven, sofern sie selbstständig Nahrung aufnehmen, werden hingegen durch die EU-Richtlinie 2010/63 geschützt (Richtlinie 2010/63/EU). Im Sinne des Tierschutzes bedarf es folglich weiterführender Studien, um Methoden zur Belastungsreduktion bei Eingriffen an Hühnerembryonen, insbesondere in Form von geeigneten Anästhesie- und Analgesieverfahren bei potenziell schmerzhaften Eingriffen, zu etablieren.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Hühnerembryonen werden in vielen Bereichen der Forschung zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen eingesetzt, ohne dass sie durch gesetzliche Vorgaben zur Belastungsreduktion geschützt werden. Außerdem wird die Geschlechtsbestimmung im Ei mit anschließender Tötung männlicher Embryonen seit dem Verbot des Tötens männlicher Eintagsküken Anfang 2022 in Deutschland kommerziell eingesetzt. Anhand der wissenschaftlichen Datenlage konnte bis dato jedoch kein Zeitpunkt des Einsetzens von Nozizeption (= Reizweiterleitung) und Schmerzperzeption genannt werden. Die vorliegende Studie untersuchte nozizeptive Reaktionen von Hühnerembryonen anhand von kardiovaskulären und neurohumoralen Parametern. Sie war Teil eines vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft beauftragten Forschungsprojektes, bei dem außerdem Verhaltensbeobachtungen durchgeführt sowie die elektrische Hirnaktivität aufgezeichnet wurde.

Hühnerembryonen an Bruttag (ED) 7, ED 9 und ED 12 – 18 wurden hinsichtlich der Reaktion auf einen noxischen (= tatsächlich oder potenziell gewebeschädigenden) mechanischem Reiz (*Pinch*) im Vergleich zu einer Berührung an der Schnabelbasis als Kontrolle (*Touch*) im mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) und in der Herzfrequenz (HR) untersucht. Der MAP und die HR wurden dabei mit einem Mikrotip-Katheter, der in eine Arterie der Chorioallantoismembran eingesetzt wurde, aufgezeichnet. Außerdem wurde eine Reaktion der Katecholamine Dopamin (DOPA), Norepinephrin (NE) und Epinephrin (E) nach *Pinch* im Vergleich zu *Touch* bei Embryonen von ED 15 bis 18 untersucht. Hierfür wurde Allantois-/Amnionflüssigkeit vor und zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Reiz entnommen.

Der MAP von Hühnerembryonen an ED 16 bis 18 stieg nach *Pinch* im Vergleich zu *Touch* signifikant an. Ebenfalls wurden signifikante Veränderungen der HR nach *Pinch* im Vergleich zu *Touch* an ED 17 und 18 beobachtet. Die Injektion des Lokalanästhetikums Lidocain reduzierte die Reaktion im MAP auf *Pinch* bei Embryonen an ED 18 signifikant. Vereinzelt wurden Reaktionen in MAP und HR bereits bei Embryonen an ED 15 beobachtet. In den Proben der Allantois-/Amnionflüssigkeit konnte nur DOPA detektiert und quantifiziert werden. Es konnte jedoch keine Reaktion von DOPA nach *Pinch* im Vergleich zu *Touch*

dargestellt werden.

Der MAP erwies sich in der vorliegenden Studie als sensitivster Parameter zur Evaluation nozizeptiver Reaktionen bei Hühnerembryonen. Auf Basis der Ergebnisse kann die Fähigkeit zur Nozizeption an ED 15 nicht ausgeschlossen und ab ED 16 angenommen werden. Das in dieser Studie durchgeführte Versuchssetup zur Bestimmung neurohumoraler Parameter erwies sich für die Darstellung einer nozizeptiven Reaktion beim Hühnerembryo als nicht geeignet. Zusammenfassend liefert die vorliegende Studie neue Erkenntnisse zur Methodik der Erfassung kardiovaskulärer Parameter und zur Beurteilung nozizeptiver Reaktionen bei Hühnerembryonen.

VIII. SUMMARY

Chicken embryos are used in various areas of research to answer scientific questions without being protected by legal requirements to reduce stress. In addition, sex determination in the egg with subsequent killing of male embryos is being used commercially in Germany since the ban on killing male day-old chicks at the beginning of 2022. Based on the scientific data available, however, it has not yet been possible to determine the time of onset of nociception (= stimulus transmission) and pain perception. The present study investigated nociceptive reactions of chicken embryos by means of cardiovascular and neurohumoral parameters. It was part of a research project commissioned by the Federal Ministry of Food and Agriculture, which also included behavioral observations and the recording of electrical brain activity.

Chicken embryos on embryonic day (ED) 7, ED 9 and ED 12 – 18 were examined in terms of their response to a noxious (= actually or potentially tissue damaging) mechanical stimulus (*Pinch*) compared to a light touch at the base of the beak as a control (*Touch*) in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR). MAP and HR were recorded using a microtip catheter inserted into an artery of the chorioallantoic membrane. In addition, a response of the catecholamines dopamine (DOPA), norepinephrine (NE) and epinephrine (E) after *Pinch* was examined in comparison to *Touch* in embryos from ED 15 to 18. For this purpose, allantoic/amniotic fluid was collected before and at three different time points after the stimulus.

The MAP of chicken embryos at ED 16 to 18 increased significantly after *Pinch* compared to *Touch*. Significant changes in HR were also observed after *Pinch* compared to *Touch* on ED 17 and 18. Injection of the local anesthetic lidocaine significantly reduced the response of MAP after *Pinch* in ED 18 embryos. Occasionally, reactions in MAP and HR were already observed in embryos on ED 15. Only DOPA could be detected and quantified in the allantoic/amniotic fluid samples. However, no reaction of DOPA after *Pinch* could be displayed compared to *Touch*.

In the present study, MAP proved to be the most sensitive parameter for the evaluation of nociceptive reactions in chicken embryos. Based on the results, the capacity for nociception cannot be excluded at ED 15 and can be assumed from ED

16 onwards. The experimental set-up used in this study to determine neurohumoral parameters was not suitable for displaying a nociceptive response in the chicken embryo. In summary, the present study provides new insights into the methodology of recording cardiovascular parameters and the assessment of nociceptive responses in chicken embryos.

IX. TABELLENVERZEICHNIS

1. Tabellen aus den Kapiteln II – III

Tabelle 1: Eigenschaften der wichtigsten nozizeptiven afferenten Nervenfasern beim Vogel (modifiziert nach HENKE (2012a) und DOUGLAS et al. (2018)). ... 13

Tabelle 2: mittlerer SAP, DAP und MAP von Hühnerembryonen von Inkubationstag 2 bis 21 (modifiziert nach VAN MIEROP & BERTUCH (1967) und GIRARD (1973)). 38

Tabelle 3: mittlere Herzfrequenz von Hühnerembryonen von Inkubationstag 3 bis 20 (modifiziert nach GIRARD (1973) und PHUPHANIN et al. (2019)). 42

Tabelle 4: Baseline-Konzentrationen von DOPA, NE und E in pg/ml in Plasma, Allantois und Amnion des Hühnerembryos an Inkubationstag 13 (modifiziert nach EPPLE et al. (1992), GILL et al. (1994) und EPPLE et al. (1997)). 49

Tabelle 5: Konzentrationen von DOPA in ng/l aus der Allantois-/Amnionflüssigkeit von ED 15 bis 18 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. 83

2. Tabellen aus Kapitel IV

Table 1. Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP) and HR at embryonic day (ED) 7 ($n = 3$), ED9 ($n = 6$), and ED12 to ED18 ($n = 10$). Values are shown as the mean \pm standard deviation. 60

Table S1. Statistical Metrics. 81

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Figure 1. Schematic illustration of the experimental setup. A microtip catheter was inserted into a side branch of the chorioallantoic artery, and the values of blood pressure and heart rate (HR) were recorded every four seconds (created with BioRender.com)..... 59

Figure 2. Percent change in MAP post Touch and Pinch. Embryos at EDs 16 to 18 ($n = 10$) received a noxious mechanical stimulus (Pinch) and a light touch as a negative control (Touch) at the base of the beak in randomized order. (a–c) Percent change from baseline MAP after Pinch compared to Touch. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t -test (normally distributed: a and c) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: b). Mean and p values shown; a: $p = 0.0008$, b: $p = 0.0020$, c: $p = 0.0048$. (d–f) Percent change from the baseline mean value of MAP over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (Pinch and Touch); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded)..... 61

Figure 3. Percent change in HR post Touch and Pinch. Embryos at EDs 16 to 18 ($n = 10$) received a noxious mechanical stimulus (Pinch) and a light touch as a negative control (Touch) at the base of the beak in randomized order. (a–c) Percent change from baseline HR after Pinch compared to Touch. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t -test (normally distributed: b and c) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: a). Mean and p values shown; b: $p = 0.0148$, c: $p = 0.0154$; ns = no significant difference between the groups (a). (d–f) Percent change from the baseline mean value in HR over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (Pinch and Touch); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded). 63

Figure 4. Local anesthesia control group. Percent change in MAP and HR post Touch and Pinch. ED18 embryos either received a lidocaine injection (ED18 w/Lido; $n = 6$) or no lidocaine injection (ED18 w/o Lido; $n = 10$) at the base of the beak prior to stimulation (Touch and Pinch). (a) Percent change from baseline MAP after Pinch in the group without lidocaine (ED18 w/o Lido Pinch) compared to ED18 w/o Lido Touch, ED18 w/Lido Touch and ED18 w/Lido Pinch. Displayed as the mean \pm standard deviation. One-way ANOVA (normally distributed); mean and p values shown. (b) Percent change from baseline HR after Pinch in the group without lidocaine (ED18 w/o Lido Pinch) compared to ED18 w/o Lido Touch, ED18 w/Lido Touch and ED18 w/Lido Pinch. Displayed as the mean \pm standard deviation. Kruskal–Wallis test (not normally distributed); mean and p values shown. (c,d) Percent change from the baseline mean value in MAP and HR after Pinch over time; values recorded every four seconds for one minute before and one minute after stimulation (ED18 w/o or w/Lido Pinch); values shown as the mean \pm standard deviation (shaded)..... 65

Figure S1. Percent change in MAP post Touch and Pinch. a–i Embryos at embryonic day (ED) 7 ($n=3$), ED9 ($n=6$) and EDs 12 to 18 ($n=10$) received a mechanical noxious stimulus (Pinch) and a light touch as control (Touch) at the base of the beak in randomized order. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t -test (normally distributed: c, d, g and i) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: a, b, e, f and h). Mean and p values shown; g: $p=0.0008$, h:

$p=0.0020$ and $i: p=0.0048$; ns = no significant difference between the groups. . 77

Figure S2. Percent change from the baseline mean value in MAP over time. a-f Embryos at ED7 ($n=3$), ED9 ($n=6$) and EDs 12 to 15 ($n=10$) received a mechanical noxious stimulus (Pinch) and a light touch as control (Touch) at the base of the beak in randomized order. Values were recorded every four seconds for one minute before and after stimulation (Touch and Pinch). Values are shown as the mean \pm standard deviation (shaded)..... 78

Figure S3. Figure S3. Percent change in HR post Touch and Pinch. a-i Embryos at ED7 ($n=3$), ED9 ($n=6$) and EDs 12 to 18 ($n=10$) received a mechanical noxious stimulus (Pinch) and a light touch as control (Touch) at the base of the beak in randomized order. Displayed as the mean \pm standard deviation. Paired t-test (normally distributed: a, d-f, h and i) or Wilcoxon signed-rank test (not normally distributed: b, c and g). Mean and p values shown; h: $p=0.0148$ and i: $p=0.0154$; ns = no significant difference between the groups. 79

Figure S4. Percent change from the baseline mean value in HR over time. a-f Embryos at ED7 ($n=3$), ED9 ($n=6$) and EDs 12 to 15 ($n=10$) received a mechanical noxious stimulus (Pinch) and a light touch as control (Touch) at the base of the beak in randomized order. Values were recorded every four seconds for one minute before and after stimulation (Touch and Pinch). Values are shown as the mean \pm standard deviation (shaded)..... 80

XI. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelmelek H, Fechtali T, Filali-Zegzouti Y, Rouanet J, Cottet-Emard J, Pequignot J, Barré H. Responsiveness of plasma catecholamines to intracerebroventricular injection of glucagon in Muscovy ducklings. *J Neural Transm* 2001; 108: 793-801.

Acierno MJ, da Cunha A, Smith J, Tully TN, Guzman DS, Serra V, Mitchell MA. Agreement between direct and indirect blood pressure measurements obtained from anesthetized Hispaniolan Amazon parrots. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1587-1590.

Akiyama R, Ono H, Höchel J, Pearson J, Tazawa H. Non-invasive determination of instantaneous heart rate in developing avian embryos by means of acoustocardiogram. *Med Biol Eng Comput* 1997; 35: 323-327.

Akiyama R, Matsuhisa A, Pearson JT, Tazawa H. Long-term measurement of heart rate in chicken eggs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999; 124: 483-490.

Aladjem S, Rest J, Stojanovic J. Fetal heart rate responses to fetal movements. *Br J Obstet Gynaecol* 1977; 84: 487-491.

Aleksandrowicz E, Herr I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *ALTEX* 2015; 32: 143-147.

Allen C, Trestman M. Animal Consciousness. In: *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*, Summer 2024 Edition. Zalta EN, Nodelman U. (<https://plato.stanford.edu/archives/sum2024/entries/consciousness-animal/>).

Altimiras J, Crossley DA. Control of blood pressure mediated by baroreflex changes of heart rate in the chicken embryo (*Gallus gallus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: 980-986.

Altimiras J, Crossley DA, Villamor E. Prenatal development of cardiovascular

regulation in avian species. In: Cardio-respiratory control in vertebrates: comparative and evolutionary aspects, 1. Auflage. Glass ML, Wood SC, Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2009: 397-427.

American Veterinary Medical Association (AVMA). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020. (<https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>).

Anand KJ, Sippell WG, Aynsley-Green A. Randomised trial of fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response. *Lancet* 1987; 1: 62-66.

Anand KJ, Craig KD. New perspectives on the definition of pain. *Pain-Journal of the International Association for the Study of Pain* 1996; 67: 3-6.

Anand KJ, Maze M. Fetuses, fentanyl, and the stress response: signals from the beginnings of pain? *Anesthesiology* 2001; 95: 823-825.

Andrewartha SJ, Tazawa H, Burggren WW. Embryonic control of heart rate: examining developmental patterns and temperature and oxygenation influences using embryonic avian models. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178: 84-96.

Andrianov EA, Sudakov AN, Andrianov AA, Skolznev NY. Non-invasive monitoring of avian embryo heart rate. *J Anim Behav Biometeorol* 2020; 7: 119-122.

Animal Care and Use Committee (ACUC). Euthanasia Guidelines. 2024. (<https://acuc.berkeley.edu/guidelines/Euthanasia%20Guidelines.pdf>).

Apkarian AV. Nociception, Pain, Consciousness, and Society: A Plea for Constrained Use of Pain-related Terminologies. *J Pain* 2018; 19: 1253-1255.

Aubert AE, Leribaux C, Beckers F, Ramaekers D, Berckmans D. Noninvasive

measurement of heart rate from chicken embryos in the egg. In: Computers in Cardiology 2000. Vol. 27 (Cat. 00CH37163), Cambridge, MA, USA, 2000; 227-230.

Aubert AE, Beckers F, Ramaekers D, Verheyden B, Leribaux C, Aerts JM, Berckmans D. Heart rate and heart rate variability in chicken embryos at the end of incubation. *Exp Physiol* 2004; 89: 199-208.

Baker BI, Machin KL, Schwean-Lardner K. When pain and stress interact: Looking at stress-induced analgesia and hyperalgesia in birds. *World's Poult Sci J* 2019; 75: 457-468.

Balaban E, Desco M, Vaquero JJ. Waking-like brain function in embryos. *Curr Biol* 2012; 22: 852-861.

Bartocci M, Bergqvist LL, Lagercrantz H, Anand KJ. Pain activates cortical areas in the preterm newborn brain. *Pain* 2006; 122: 109-117.

Bateson P. Assessment of pain in animals. *Anim Behav* 1991; 42: 827-839.

Beausoleil NJ, Holdsworth SE, Lehmann H. Avian nociception and pain. In: *Sturkie's Avian Physiology*, 7. Auflage. Scanes CG, Dridi S, Hrsg. London: Academic Press 2022; 223-231.

Bell A. The neurobiology of acute pain. *Vet J* 2018; 237: 55-62.

Bellieni CV. Analgesia for fetal pain during prenatal surgery: 10 years of progress. *Pediatr Res* 2021; 89: 1612-1618.

Bellieni CV. New insights into fetal pain. *Semin Fetal Neonatal Med* 2019; 24: 101001.

Berger PJ, Walker AM, Horne R, Brodecky V, Wilkinson MH, Wilson F, Maloney

JE. Phasic respiratory activity in the fetal lamb during late gestation and labour. *Respir Physiol* 1986; 65: 55-68.

Beuving G, Vonder GM. Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen Comp Endocrinol* 1978; 35: 153-159.

Bjørnstad S, Austdal LP, Roald B, Glover JC, Paulsen RE. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 355: 386-396.

Boucek RJ, Bourne BB. Catecholamines of the allantoic fluid in the developing chick embryo. *Nature* 1962; 193: 1181-1182.

Branum SR, Yamada-Fisher M, Burggren WW. Reduced heart rate and cardiac output differentially affect angiogenesis, growth, and development in early chicken embryos (*Gallus domesticus*). *Physiol Biochem Zool* 2013; 86: 370-382.

Brusseau R, Myers L. Developing consciousness: fetal anesthesia and analgesia. In: *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*. Saunders WB 2006; 25: 189-195.

Burggren WW, Tazawa H, Thompson D. Genetic and maternal environmental influences on embryonic physiology: intraspecific variability in avian embryonic heart rates. *Isr J Ecol Evol* 1994; 40: 351-362.

Burggren WW, Warburton SJ, Slivkoff MD. Interruption of cardiac output does not affect short-term growth and metabolic rate in day 3 and 4 chick embryos. *J Exp Biol* 2000; 203: 3831-3838.

Burggren WW, Khorrami S, Pinder A, Sun T. Body, eye, and chorioallantoic vessel growth are not dependent on cardiac output level in day 3-4 chicken embryos. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1399-1406.

Burggren WW. Cardiovascular Development and Angiogenesis in the Early Vertebrate Embryo. *Cardiovasc Eng Technol* 2013; 4: 234-245.

Butler DG, Wilson JX. Cardiovascular function in adrenalectomized Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1985; 81: 353-358.

Campbell RM, Scanes CG. Adrenergic control of lipogenesis and lipolysis in the chicken in vitro. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1985; 82: 137-142.

Carsia RV. Adrenals. In: *Sturkie's Avian Physiology*, 7. Auflage. Scanes CG, Dridi S, Hrsg. London: Academic Press 2022; 861-894.

Chatterjee D, Arendt KW, Moldenhauer JS, Olutoye OA, Parikh JM, Tran KM, Zaretsky MV, Zhou J, Rollins MD. Anesthesia for Maternal-Fetal Interventions: A Consensus Statement From the American Society of Anesthesiologists Committees on Obstetric and Pediatric Anesthesiology and the North American Fetal Therapy Network. *Anesth Analg* 2021; 132: 1164-1173.

Chiba Y, Fukuoka S, Niiya A, Akiyama R, Tazawa H. Development of cholinergic chronotropic control in chick (*Gallus gallus domesticus*) embryos. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2004; 137: 65-73.

Chumak VI. Dinamika reflektomykh reaktsii i vklyuchenie retseptornykh apparatov u embriona kuritsy (Dynamics of reflex reactions and initiation of receptor systems in the chick embryo). In *Voprosy fiziologii i patologii tsentral'noi nervnoi sistemy cheloveka i zhivotnykh v ontogeneze*, Hrsg. Sbornik: Moskau, UdSSR 1961: 63-68.

Clewlow F, Dawes GS, Johnston BM, Walker DW. Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol* 1983; 341: 463-476.

Clinton M, Nandi S, Zhao D, Olson S, Peterson P, Burdon T, McBride D. Real-Time Sexing of Chicken Embryos and Compatibility with in ovo Protocols. *Sex Dev* 2016; 10: 210-216.

Cooley K. Physiology of Pain. In: Pain Management for Veterinary Technicians and Nurses. Goldberg ME, Shaffran N, Hrsg. Oxford, UK: Wiley-Blackwell 2015; 30-41.

Cortelli P, Giannini G, Favoni V, Cevoli S, Pierangeli G. Nociception and autonomic nervous system. *Neurol Sci* 2013; 34: 41-46.

Cramb G, Langslow DR, Phillips JH. Hormonal effects on cyclic nucleotides and carbohydrate and lipid metabolism in isolated chicken hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 46: 310-321.

Crossley DA 2nd, Altimiras J. Ontogeny of cholinergic and adrenergic cardiovascular regulation in the domestic chicken (*Gallus gallus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: 1091-1098.

Crossley DA 2nd, Hicks JW, Thornburg K. A comparison of cardiovascular regulatory mechanisms present during fowl ontogeny; white leghorn vs. bantam chickens. *Abstr Ann Meet Soc Integrat Comp Biol* 2003: 147.

Crossley DA 2nd, Jonker SS, Hicks JW, Thornburg KL. Maturation of the angiotensin II cardiovascular response in the embryonic White Leghorn chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Physiol B* 2010; 180: 1057-1065.

Da Silva M, Labas V, Nys Y, Réhault-Godbert S. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development. *Poul Sci* 2017; 96: 2931-2941.

Danbury TC, Weeks CA, Chambers JP, Waterman-Pearson AE, Kestin SC. Self-selection of the analgesic drug carprofen by lame broiler chickens. *Vet Rec* 2000;

146: 307-311.

Darnall RA. The carotid body and arousal in the fetus and neonate. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 185: 132-143.

Davis GS, Anderson KE, Carroll AS. The effects of long-term caging and molt of Single Comb White Leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. *Poult Sci* 2000a; 79: 514-518.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000b; 405: 183-187.

Davis GS, Anderson KE, Jones DR. The effects of different beak trimming techniques on plasma corticosterone and performance criteria in Single Comb White Leghorn hens. *Poult Sci* 2004; 83: 1624-1628.

Dawes GS. The 1987 James A. F. Stevenson memorial lecture. The development of fetal behavioural patterns. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66: 541-548.

De Haas EN, Oliemans E, van Gerwen M. The Need for an Alternative to Culling Day-Old Male Layer Chicks: A Survey on Awareness, Alternatives, and the Willingness to Pay for Alternatives in a Selected Population of Dutch Citizens. *Front Vet Sci* 2021; 8: 662197.

De Jong WH, De Vries EG, Wolffenbuttel BH, Kema IP. Automated mass spectrometric analysis of urinary free catecholamines using on-line solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 1506-1512.

Derbyshire SW, Raja A. On the development of painful experience. *J Conscious Stud* 2011; 18: 233-256.

Derbyshire SW, Bockmann JC. Reconsidering fetal pain. *J Med Ethics* 2020; 46: 3-6.

Devor M, Rappaport I, Rappaport ZH. Does the Golem Feel Pain? Moral Instincts and Ethical Dilemmas Concerning Suffering and the Brain. *Pain Pract* 2015; 15: 497-508.

Douglas JM, Sanchez-Migallon Guzman D, Paul-Murphy JR. Pain in Birds: The Anatomical and Physiological Basis. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2018; 21: 17-31.

Dubbeldam JL. The trigeminal system in birds and nociception. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2009; 9: 150-158.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010; 120: 3760-3772.

Duff EP, Moultrie F, van der Vaart M, Goksan S, Abos A, Fitzgibbon SP, Baxter L, Wager TD, Slater R. Inferring pain experience in infants using quantitative whole-brain functional MRI signatures: a cross-sectional, observational study. *Lancet Digit Health* 2020; 2: 458-467.

Dunwiddie TV, Worth T. Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 70-76.

Dzialowski EM, Sotherland PR. Maternal effects of egg size on emu *Dromaius novaehollandiae* egg composition and hatchling phenotype. *J Exp Biol* 2004; 207: 597-606.

Dzialowski EM, Sirsat T, van der Sterren S, Villamor E. Prenatal cardiovascular shunts in amniotic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178: 66-74.

Dzialowski EM, Crossley DA, 2nd. The Cardiovascular System. In: Sturkie's Avian

Physiology, 7. Auflage. Scanes CG, Dridi S, Hrsg. London: Academic Press 2022; 327-409.

Eide AL, Glover JC. Development of the longitudinal projection patterns of lumbar primary sensory afferents in the chicken embryo. *J Comp Neurol* 1995; 353: 247-259.

Eide AL, Glover JC. Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 195: 237-250.

Elfving M, Lundengård K, Altimiras J. Fetal development of baroreflex sensitivity: the chicken embryo as a case model. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178: 75-83.

Elwood RW. Pain and suffering in invertebrates? *ILAR J* 2011; 52: 175-184.

Epple A, Gill TS, Nibbio B. The avian allantois: a depot for stress-released catecholamines. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 85: 462-476.

Epple A, Gower B, Busch MT, Gill T, Milakofsky L, Piechotta R, Nibbio B, Hare T, Stetson MH. Stress responses in avian embryos. *Am Zool* 1997; 37: 536-545.

Feinstein JS, Khalsa SS, Salomons TV, Prkachin KM, Frey-Law LA, Lee JE, Tranel D, Rudrauf D. Preserved emotional awareness of pain in a patient with extensive bilateral damage to the insula, anterior cingulate, and amygdala. *Brain Struct Funct* 2016; 221: 1499-1511.

Fernández-López A, Revilla V, Candelas MA, González-Gil J, Díaz A, Pazos A. A comparative study of alpha2- and beta-adrenoceptor distribution in pigeon and chick brain. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 871-883.

Filali-Zegzouti Y, Abdelmelek H, Rouanet JL, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Barré H. Role of catecholamines in glucagon-induced thermogenesis. *J Neural*

Transm 2005; 112: 481-489.

Fisk NM, Gitau R, Teixeira JM, Giannakoulopoulos X, Cameron AD, Glover VA. Effect of direct fetal opioid analgesia on fetal hormonal and hemodynamic stress response to intrauterine needling. *Anesthesiology* 2001; 95: 828-835.

Fujita H, Tanizawa Y, Hiura M. Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. In: Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Coupland RE, Fujita T, Hrsg. Amsterdam: Elsevier 1976: 191-208.

Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G. In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2016; 88: 8657-8663.

Gangnat IDM, Mueller S, Kreuzer M, Messikommer RE, Siegrist M, Visschers VHM. Swiss consumers' willingness to pay and attitudes regarding dual-purpose poultry and eggs. *Poult Sci* 2018; 97: 1089-1098.

Gentle MJ, Wood-Gush DGM. Observations of the behaviour of *Gallus domesticus* following telencephalic removal. *Behav. Biol.* 1976; 1: 223-231.

Gentle MJ. Oral behaviour following forebrain ablations in *Gallus Domesticus*. *Behav Processes* 1981; 6: 109-120.

Gentle MJ, Jones RB, Woolley SC. Physiological changes during tonic immobility in *Gallus gallus var domesticus*. *Physiol Behav* 1989; 46: 843-847.

Gentle MJ. Pain in Birds. *Anim Welf* 1992; 1: 235-247.

Gentle MJ, Hunter LN. Physiological and behavioural responses associated with feather removal in *Gallus gallus var domesticus*. *Res Vet Sci* 1991; 50: 95-101.

Gentle MJ, Corr SA. Endogenous analgesia in the chicken. *Neurosci Lett* 1995;

201: 211-214.

Gentle MJ, Hunter LN, Corr SA. Effects of caudolateral neostriatal ablations on pain-related behaviour in the chicken. *Physiol Behav* 1997; 61: 493-498.

Gentle MJ, Tilston VL. Reduction in peripheral inflammation by changes in attention. *Physiol Behav* 1999; 66: 289-292.

Gentle MJ. Pain issues in poultry. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011; 135: 252-258.

George L, Chaverra M, Todd V, Lansford R, Lefcort F. Nociceptive sensory neurons derive from contralaterally migrating, fate-restricted neural crest cells. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1287-1293.

Gesetz zur Änderung des Tierschutzgesetzes – Verbot des Kükentötens. Bundesgesetzblatt, Bonn, 2021. (https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//*%5b@attr_id=%27bgbl121s1826.pdf%27%5d).

Ghosh A, Carmichael SW, Mukherjee M. Avian adrenal medulla: cytomorphology and function. *Acta Biol Szeged* 2001; 45: 1-11.

Gill TS, Porta S, Nibbio B, Epple A. Sulfate conjugates of catecholamines in the allantoic fluid of the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol* 1994; 96: 255-258.

Gingras JL, O'Donnell KJ. State control in the substance-exposed fetus. I. The fetal neurobehavioral profile: an assessment of fetal state, arousal, and regulation competency. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 846: 262-276.

Gingras JL, Mitchell EA, Grattan KE. Fetal homologue of infant crying. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90: 415-418.

Girard H. Arterial pressure in the chick embryo. *Am J Physiol* 1973; 224: 454-460.

Glatz PC, Lunam CA. Production and heart rate responses of chickens beak-trimmed at hatch or at 10 or 42 days of age. *Aust J Exp Agr* 1994; 34: 443-447.

Göhler D, Fischer B, Meissner S. In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poult Sci* 2017; 96: 1-4.

Goksan S, Baxter L, Moultrie F, Duff E, Hathway G, Hartley C, Tracey I, Slater R. The influence of the descending pain modulatory system on infant pain-related brain activity. *Elife* 2018; 7: e37125.

Goodlin RC. Fetal arousal by external stimuli. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 146: 744-745.

Green G, Hartley C, Hoskin A, Duff E, Shriver A, Wilkinson D, Adams E, Rogers R, Moultrie F, Slater R. Behavioural discrimination of noxious stimuli in infants is dependent on brain maturation. *Pain* 2019; 160: 493-500.

Groenendijk BCW, Stekelenburg-de Vos S, Vennemann P, Wladimiroff JW, Nieuwstadt FTM, Lindken R, Westerweel J, Hierck BP, Ursem NTC, Poelmann RE. The endothelin-1 pathway and the development of cardiovascular defects in the haemodynamically challenged chicken embryo. *J Vasc Res* 2007; 45: 54-68.

Güntürkün O. The convergent evolution of neural substrates for cognition. *Psychol Res* 2012; 76: 212-219.

Gursul D, Hartley C, Slater R. Nociception and the neonatal brain. *Semin Fetal Neonatal Med* 2019; 24: 101016.

Habermann F, Feske D, Tönhardt H. ECG measurement in chick embryos using non-invasive technology. *World's Poult Sci J* 2008; 64: 605-610.

Hall CE, Hurtado R, Hewett KW, Shulimovich M, Poma CP, Reckova M, Justus C, Pennisi DJ, Tobita K, Sedmera D, Gourdie RG, Mikawa T. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development* 2004; 131: 581-592.

Harding R, Poore ER, Cohen GL. The effect of brief episodes of diminished uterine blood flow on breathing movements, sleep states and heart rate in fetal sheep. *J Dev Physiol* 1981; 3: 231-243.

Hashimoto Y, Narita T, Tazawa H. Cardiogenic ballistograms of chicken eggs: comparison of measurements. *Med Biol Eng Comput* 1991; 29: 393-297.

Hatfield LA. Neonatal pain: What's age got to do with it? *Surg Neurol Int* 2014; 5: 479-489.

Hellyer PW, Robertson SA, Fails AD. Pain and Its Management. In: Lumb & Jones' *Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 4. Auflage. Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, Hrsg. Iowa, USA: Blackwell Publishing 2007; 31-57.

Hendrickson CM, Lin S. Opiate receptors in highly purified neuronal cell populations isolated in bulk from embryonic chick brain. *Neuropharmacology* 1980; 19: 731-739.

Henke J, Tacke S, Erhardt W. Analgesie: Anatomische und neuro-physiologische Grundlagen des Schmerzes. 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 2012a; 398-404.

Henke J, Tacke S, Erhardt W. 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 2012b; 385-398.

Ho DH, Burggren WW. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *J Exp Biol* 2010; 213: 3-16.

Ho DH, Reed WL, Burggren WW. Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. *J Exp Biol* 2011; 214: 619-628.

Ho DH, Burggren WW. Parental hypoxic exposure confers offspring hypoxia resistance in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol* 2012; 215: 4208-4016.

Höchel J, Akiyama R, Masuko T, Pearson JT, Nichelmann M, Tazawa H. Development of heart rate irregularities in chick embryos. *Am J Physiol* 1998; 275: 527-533.

Holloway JA, Trough CO, Wright LE, Keyser GF. Cutaneous receptive field characteristics of primary afferents and dorsal horn cells in the avian (*Gallus domesticus*). *Exp Neurol* 1980; 68: 477-488.

Holmes WN, Phillips JG. The adrenal cortex of birds. In: General and comparative endocrinology of the adrenal cortex, 1. Auflage. Chester-Jones I, Henderson IW, Hrsg. London: Academic Press 1976; 293-420.

Humayun KAKM, Aoyama M, Sugita S. Morphological and histological studies on the adrenal gland of the chicken (*Gallus domesticus*). *J Poult Sci* 2012; 49: 39-45.

Iannetti GD, Mouraux A. From the neuromatrix to the pain matrix (and back). *Exp Brain Res* 2010; 205: 1-12.

Ignarro LJ, Shideman F. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. *J Pharmacol Exp Ther* 1968a; 159: 38-48.

Ignarro LJ, Shideman F. Norepinephrine and epinephrine in the embryo and

embryonic heart of the chick: uptake and subcellular distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 1968b; 159: 49-58.

Ioffe S, Jansen AH, Russell BJ, Chernick V. Sleep, wakefulness and the monosynaptic reflex in fetal and newborn lambs. *Pflugers Arch* 1980; 388: 149-157.

Jarvis ED, Güntürkün O, Bruce L, Csillag A, Karten H, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Perkel DJ, Shimizu T, Striedter G, Wild JM, Ball GF, Dugas-Ford J, Durand SE, Hough GE, Husband S, Kubikova L, Lee DW, Mello CV, Powers A, Siang C, Smulders TV, Wada K, White SA, Yamamoto K, Yu J, Reiner A, Butler AB. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 151-159.

Jarvis ED. Evolution of the Pallium in Birds and Reptiles. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, Hrsg. Berlin, Heidelberg: Springer 2009: 1390-1400.

Jones L, Verriotis M, Cooper RJ, Laudiano-Dray MP, Rupawala M, Meek J, Fabrizi L, Fitzgerald M. Widespread nociceptive maps in the human neonatal somatosensory cortex. *Elife* 2022; 11: e71655.

Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 2002; 108: 421-430.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.

Kadic AS, Kurjak A. Cognitive Functions of the Fetus. *Ultraschall Med* 2018; 39: 181-189.

Kanold PO, Luhmann HJ. The subplate and early cortical circuits. *Annu Rev Neurosci* 2010; 33: 23-48.

Kata CI, Rowland S, Goldberg ME. Pain Recognition in Companion Species, Horses, and Livestock. In: Pain Management for Veterinary Technicians and Nurses, 1. Auflage. Goldberg ME, Shaffran N, Hrsg. Oxford, UK: Wiley-Blackwell 2015; 15-29.

Khandoker A, Dzialowski E, Burggren WW, Tazawa H. Cardiac rhythms of late pre-pipped and pipped chick embryos exposed to altered oxygen environments. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136: 289-299.

Klinck MP, Troncy E. The physiology and pathophysiology of pain. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia, 3. Auflage. Duke-Novakovski T, de Vries M, Seymour C, Hrsg. Quedgeley, UK: British Small Animal Veterinary Association 2016; 97-112.

Knight D, Baker P. Observations on the muscarinic activation of catecholamine secretion in the chicken adrenal. *Neuroscience* 1986; 19: 357-66.

Kollmansperger S, Anders M, Werner J, Saller AM, Weiss L, Süß SC, Reiser J, Schneider G, Schusser B, Baumgartner C, Fenzl T. Nociception in Chicken Embryos, Part II: Embryonal Development of Electroencephalic Neuronal Activity In Ovo as a Prerequisite for Nociception. *Animals* 2023; 13: 2839.

Koltzenburg M, Lewin GR. Receptive properties of embryonic chick sensory neurons innervating skin. *J Neurophysiol* 1997; 78: 2560-2568.

Kostović I, Judas M. The development of the subplate and thalamocortical connections in the human foetal brain. *Acta Paediatr* 2010; 99: 1119-1127.

Krautwald-Junghanns ME, Cramer K, Fischer B, Förster A, Galli R, Kremer F, Mapesa EU, Meissner S, Preisinger R, Preusse G, Schnabel C, Steiner G, Bartels T. Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poult Sci* 2018; 97: 749-757.

Kuenzel WJ. Neurobiological basis of sensory perception: welfare implications of beak trimming. *Poult Sci* 2007; 86: 1273-1282.

Lacombe AM, Jones DR. The source of circulating catecholamines in forced dived ducks. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 80: 41-47.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009; 10: 895-926.

Lee SJ, Ralston HJP, Drey EA, Partridge JC, Rosen MA. Fetal pain: a systematic multidisciplinary review of the evidence. *JAMA* 2005; 294: 947-954.

Lehmann HS, Musk GC, Laurence M, Hyndman TH, Tuke J, Collins T, Glerup KB, Johnson CB. Mitigation of electroencephalographic and cardiovascular responses to castration in *Bos indicus* bulls following the administration of either lidocaine or meloxicam. *Vet Anaesth Analg* 2017; 44: 1341-1352.

Leibson LG, Stabrovski EM. Adrenaline and noradrenaline in adrenals of developing chick embryos. *Sechenov Physiol J USSR* 1962; 48: 857-863.

Lewin R, Dörner M, Tönhardt H. Pulse oximetry: a new way of determining the heart rate in chicken embryos. *Pflugers Arch* 1997; 434: 639-641.

Lim Y, Godambe S. Prevention and Management of Procedural Pain in the Neonate: An Update. *Pediatrics* 2016; 137: e20154271.

Lowery CL, Hardman MP, Manning N, Hall RW, Anand KJ, Clancy B. Neurodevelopmental changes of fetal pain. *Semin Perinatol* 2007; 31: 275-282.

Machin KL, Livingston A. Assessment of the analgesic effects of ketoprofen in ducks anesthetized with isoflurane. *Am J Vet Res* 2002; 63: 821-826.

Machin KL. Avian Pain: Physiology and Evaluation. *Compend Contin Educ Pract*

Vet 2005; 27: 98-109.

Maksimov VF, Korostyshevskaya IM. Morphogenesis and reaction to hypoxia of atrial myoendocrine cells in chick embryos (*Gallus gallus*). *J Evol Biochem Physiol* 2013; 49: 251-258.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 437-473.

Medina L, Reiner A. Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? *Trends Neurosci* 2000; 23: 1-12.

Mellor DJ, Diesch TJ, Gunn AJ, Bennet L. The importance of 'awareness' for understanding fetal pain. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 49: 455-471.

Mellor DJ, Diesch TJ. Onset of sentience: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. *Appl Anim Behav Sci* 2006; 100: 48-57.

Mellor DJ, Diesch TJ. Birth and hatching: key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *N Z Vet J* 2007; 55: 51-60.

Mellor DJ, Diesch TJ, Gunn AJ, Bennet L. Fetal 'awareness' and 'pain': What precautions should be taken to safeguard fetal welfare during experiments? *AATEX J* 2007; 14: 79-83.

Mellor DJ. Galloping colts, fetal feelings, and reassuring regulations: putting animal-welfare science into practice. *J Vet Med Educ* 2010; 37: 94-100.

Molony V, Kent JE. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 1997; 75: 266-272.

Moneva P, Popova-Ralcheva S, Gudev D, Sredkova V, Yanchev I. Stress response dynamics in ACTH and formalin treated chickens. *Bulg J Agric Sci* 2008; 14: 598-

605.

Moriya K, Höchel J, Pearson JT, Tazawa H. Cardiac rhythms in developing chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999; 124: 461-468.

Moriya K, Pearson JT, Burggren WW, Ar A, Tazawa H. Continuous measurements of instantaneous heart rate and its fluctuations before and after hatching in chickens. *J Exp Biol* 2000; 203: 895-903.

Mouraux A, Diukova A, Lee MC, Wise RG, Iannetti GD. A multisensory investigation of the functional significance of the "pain matrix". *Neuroimage* 2011; 54: 2237-2249.

Mueller CA, Burggren WW, Tazawa H. The Physiology of the Avian Embryo. In: *Sturkie's Avian Physiology*, 7. Auflage. Scanes CG, Dridi S, Hrsg. London: Academic Press 2022; 995-1026.

Muir WW 3rd, Woolf CJ. Mechanisms of pain and their therapeutic implications. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1346-1356.

Mulder AL, van Golde JC, van Goor AAC, Giussani DA, Blanco CE. Developmental changes in plasma catecholamine concentrations during normoxia and acute hypoxia in the chick embryo. *J Physiol* 2000; 527: 593-599.

Mulder TL, van Golde JC, Prinzen FW, Blanco CE. Cardiac output distribution in the chick embryo from stage 36 to 45. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 525-528.

Murawska D, Gesek M, Witkowska D. Suitability of layer-type male chicks for capon production. *Poult Sci* 2019; 98: 3345-3351.

Nasr MA, Browne WJ, Caplen G, Hothersall B, Murrell JC, Nicol CJ. Positive affective state induced by opioid analgesia in laying hens with bone fractures. *Appl Anim Behav Sci* 2013; 147: 127-131.

Nijhuis JG, Prechtl HF, Martin CB, Jr., Bots RS. Are there behavioural states in the human fetus? *Early Hum Dev* 1982; 6: 177-195.

Nishimura H, Yang Y, Hubert C, Gasc J-M, Ruijtenbeek K, De Mey J, Boudier HS, Corvol P. Maturation-dependent changes of angiotensin receptor expression in fowl. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: 231-242.

Northcutt RG, Kaas JH. The emergence and evolution of mammalian neocortex. *Trends Neurosci* 1995; 18: 373-379.

Norton ME, Cassidy A, Ralston SJ, Chatterjee D, Farmer D, Beasley AD, Dragoman M. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #59: The use of analgesia and anesthesia for maternal-fetal procedures. *Am J Obstet Gynecol* 2021; 225: B2-B8.

Ohmori Y. Localization of biogenic amines and neuropeptides in adrenal medullary cells of birds. *Horm Metab Res* 1998; 30: 384-388.

Pappano AJ, Löffelholz K. Ontogenesis of adrenergic and cholinergic neuroeffector transmission in chick embryo heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1974; 191: 468-478.

Pasley BN, Mayes LC, Schultz RT. Subcortical discrimination of unperceived objects during binocular rivalry. *Neuron* 2004; 42: 163-172.

Patten BM. *Early embryology of the chick*, 4. Auflage. Hrsg. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Co. 1952.

Paul-Murphy J, Ludders JW. Avian analgesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2001; 4: 35-45.

Paul-Murphy J, McCutcheon RA, Standing B. Using emission tomography imaging of the parrot brain to study response to clinical pain. *Proc 9th Conf Euro Assoc Avian Vet* 2007: 293-297.

Peters JJ, Vonderahe AR, Powers TH. The functional chronology in developing chick nervous system. *J Exp Zool* 1956; 133: 505-518.

Peters JJ, Vonderahe AR, Schmid D. Onset of cerebral electrical activity associated with behavioral sleep and attention in the developing chick. *J Exp Zool* 1965; 160: 255-261.

Phuphanin A, Sampanporn L, Sutapun B. Smartphone-Based Device for Non-Invasive Heart-Rate Measurement of Chicken Embryos. *Sensors* 2019; 19: 4843.

Pierucci R. Fetal Pain: The Science Behind Why It Is the Medical Standard of Care. *Linacre Q* 2020; 87: 311-316.

Pierucci R. Fetal Pain: What is the Scientific Evidence? *Issues Law Med* 2021; 36: 113-122.

Pirow R, Bilsing R, Nichelmann M, Höchel J. A method for noninvasive, long-term recording of the avian embryo heart rate. *Physiol Behav* 1995; 58: 185-189.

Powell H, Morgan M, Sear JW. Pregnanolone: a new steroid intravenous anaesthetic. Dose-finding study. *Anaesthesia* 1992; 47: 287-290.

Price J, Nolan A. The physiology and pathophysiology of pain. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia*, 2. Auflage. Duke-Novakovski T, Seymour C, Hrsg. Quedgeley, UK: British Small Animal Veterinary Association 2007: 79-88.

Rahn H, Poturalski SA, Paganelli CV. The acoustocardiogram: a noninvasive method for measuring heart rate of avian embryos in ovo. *J Appl Physiol* (1985) 1990; 69: 1546-1548.

Raivich G, Zimmermann A, Sutter A. The spatial and temporal pattern of beta NGF receptor expression in the developing chick embryo. *EMBO J* 1985; 4: 637-644.

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020; 161: 1976-1982.

Rashidi H, Sottile V. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays* 2009; 31: 459-465.

Reithmayer C, Mußhoff O. Consumer preferences for alternatives to chick culling in Germany. *Poult Sci* 2019; 98: 4539-4548.

Reithmayer C, Danne M, Mußhoff O. Societal attitudes towards in ovo gender determination as an alternative to chick culling. *Agribusiness* 2021; 37: 306-323.

RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *EU Official Journal* 2010; L276: 33-79.

Rosenbruch M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX* 1997; 14: 111-113.

Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (RCOG). Fetal Awareness Review of Research and Recommendations for Practice. 2010. (<https://www.rcog.org.uk/media/xujjh2hj/rcogfetalawarenesswpr0610.pdf>).

Ruíz-López P, Domínguez JM, Granados MDM. Intraoperative nociception-antinociception monitors: A review from the veterinary perspective. *Vet Anaesth Analg* 2020; 47: 152-159.

Sakamoto Y, Haque MA, Ono H, Pearson J, Tazawa H. Two-dimensional cardiogenic ballistic movements of avian eggs. *Med Biol Eng Comput* 1995; 33: 611-614.

Saller AM, Werner J, Reiser J, Senf S, Deffner P, Abendschön N, Weiß C, Fischer J, Schörwerth A, Miller R, Zablotski Y, Bergmann S, Erhard MH, Ritzmann M, Zöls S, Baumgartner C. Local anesthesia in piglets undergoing castration-A comparative study to investigate the analgesic effects of four local anesthetics on the basis of acute physiological responses and limb movements. *PLoS One* 2020; 15: e0236742.

Salomons TV, Iannetti GD, Liang M, Wood JN. The "Pain Matrix" in Pain-Free Individuals. *JAMA Neurol* 2016; 73: 755-756.

Salomons TV, Iannetti GD. Fetal pain and its relevance to abortion policy. *Nat Neurosci* 2022; 25: 1396-1398.

Sann H. Nozizeption und Schmerz. In: *Physiologie der Haustiere*, 2. Auflage. Engelhardt W, Breves G. Hrsg. Stuttgart: Enke Verlag GmbH 2004; 74-78.

Savary K, Michaud A, Favier J, Larger E, Corvol P, Gasc J-M. Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo. *Blood* 2005; 105: 103-110.

Seabra R, Bhogal N. In vivo research using early life stage models. *In Vivo* 2010; 24: 457-462.

Sekulic S, Gebauer-Bukurov K, Cvijanovic M, Kopitovic A, Ilic D, Petrovic D, Capo I, Pericin-Starcevic I, Christ O, Topalidou A. Appearance of fetal pain could be associated with maturation of the mesodiencephalic structures. *J Pain Res* 2016; 9: 1031-1038.

Sewards TV, Sewards MA. Visual awareness due to neuronal activities in subcortical structures: a proposal. *Conscious Cogn* 2000; 9: 86-116.

Shanahan M, Bingman VP, Shimizu T, Wild M, Güntürkün O. Large-scale network organization in the avian forebrain: a connectivity matrix and theoretical analysis.

Front Comput Neurosci 2013; 7: 89.

Shinozuka N, Okai T, Kuwabara Y, Mizuno M. The development of sleep-wakefulness cycle and its correlation to other behavior in the human fetus. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1989; 15: 395-402.

Shtukmaster S, Schier MC, Huber K, Krispin S, Kalcheim C, Unsicker K. Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo. *Neural Dev* 2013; 8: 12.

Silbernagl S, Despopoulos A. Zentralnervensystem und Sinne. In: Taschenatlas Physiologie, 7. Auflage. Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2007; 312-377.

Slater R, Worley A, Fabrizi L, Roberts S, Meek J, Boyd S, Fitzgerald M. Evoked potentials generated by noxious stimulation in the human infant brain. *Eur J Pain* 2010; 14: 321-326.

Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113: 187-196.

Smith ESJ, Lewin GR. Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2009; 195: 1089-1106.

Sneddon LU. Pain perception in fish: indicators and endpoints. *ILAR J* 2009; 50: 338-342.

Sneddon LU, Elwood RW, Adamo SA, Leach MC. Defining and assessing animal pain. *Anim Behav* 2014; 97: 201-212.

Sneddon LU. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda)* 2018; 33: 63-73.

St Petery LB Jr, van Mierop LH. Evidence for presence of adrenergic receptors in

the 6-day-old chick embryo. *Am J Physiol* 1974; 227: 1406-1410.

Süß SC, Werner J, Saller AM, Weiss L, Reiser J, Ondracek JM, Zablotzki Y, Kollmansperger S, Anders M, Potschka H, Schusser B, Fenzl T, Baumgartner C. Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus. *Animals* 2023; 13: 2859.

Suwanrath C, Suntharasaj T. Sleep-wake cycles in normal fetuses. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281: 449-454.

Suzuki Y, Musashi H, Tazawa H. Noninvasive heart rate monitoring system for avian embryos based on the ballistocardiogram. *Med Biol Eng Comput* 1989; 27: 399-404.

Szeto HH, Hinman DJ. Prenatal development of sleep-wake patterns in sheep. *Sleep* 1985; 8: 347-355.

Szeto HH, Zhu YS, Amione J, Clare S. Prenatal morphine exposure and sleep-wake disturbances in the fetus. *Sleep* 1988; 11: 121-130.

Tazawa H. Measurement of blood pressure of chick embryo with an implanted needle catheter. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1981; 51: 1023-1026.

Tazawa H, Lomholt JP, Johansen K. Direct measurement of allantoic blood flow in the chicken, *Gallus domesticus*. Responses to alteration in ambient temperature and PO₂. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1985; 81: 641-642.

Tazawa H, Johansen K. Comparative model analysis of central shunts in vertebrate cardiovascular systems. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1987; 86: 595-607.

Tazawa H, Suzuki Y, Musashi H. Simultaneous acquisition of ECG, BCG, and blood pressure from chick embryos in the egg. *J Appl Physiol* (1985) 1989; 67:

478-483.

Tazawa H, Hiraguchi T, Kuroda O, Tullett SG, Deeming DC. Embryonic heart rate during development of domesticated birds. *Physiol Zool* 1991; 64: 1002-1022.

Tazawa H, Hashimoto Y, Doi K. Blood pressure and heart rate of chick embryo (*Gallus domesticus*) within the egg: responses to autonomic drugs. In: Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system. Hill RB, Kuwasawa K. Hrsg. New York: Karger 1992; 86-96.

Tazawa H, Watanabe W, Burggren WW. Embryonic heart rate in altricial birds, the pigeon (*Columba domestica*) and the bank swallow (*Riparia riparia*). *Physiol Zool* 1994; 67: 1448-1460.

Tazawa H, Mitsubayashi H, Hirata M, Höchel J, Pearson JT. Cardiac rhythms in chick embryos during hatching. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999; 124: 511-521.

Tazawa H, Akiyama R, Moriya K. Development of cardiac rhythms in birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; 132: 675-689.

Tazawa H. Cardiac rhythms in avian embryos and hatchlings. *Avian Poult Biol Rev* 2005; 16: 123-150.

Thill B. Fetal Pain in the First Trimester. *Linacre Q* 2022; 89: 73-100.

Thill B. The fetal pain paradox. *Front Pain Res (Lausanne)* 2023; 4: 1128530.

Thurston R, Bryant C, Korn N. The effects of corticosterone and catecholamine infusion on plasma glucose levels in chicken (*Gallus domesticus*) and Turkey (*Meleagris gallapavo*). *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1993; 106: 59-62.

Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist.

Tong Q, Romanini CE, Exadaktylos V, Bahr C, Berckmans D, Bergoug H, Eterradossi N, Roulston N, Verhelst R, McGonnell IM, Demmers T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. *Poult Sci* 2013; 92: 620-628.

Tracey I, Johns E. The pain matrix: reloaded or reborn as we image tonic pain using arterial spin labelling. *Pain* 2010; 148: 359-360.

Ulfig N, Neudörfer F, Bohl J. Transient structures of the human fetal brain: subplate, thalamic reticular complex, ganglionic eminence. *Histol Histopathol* 2000; 15: 771-790.

Van de Pas M, Nijhuis JG, Jongsma HW. Fetal behaviour in uncomplicated pregnancies after 41 weeks of gestation. *Early Hum Dev* 1994; 40: 29-38.

Van Lieshout JJ, Wieling W, Karemaker JM, Eckberg DL. The vasovagal response. *Clin Sci (Lond)* 1991; 81: 575-586.

Van Mierop LH, Bertuch CJ Jr. Development of arterial blood pressure in the chick embryo. *Am J Physiol* 1967; 212: 43-48.

Van Scheltema PNA, Bakker SEM, Vandenbussche FPHA, Oepkes D. Fetal pain. *Fetal Matern Med Rev* 2008; 19: 311-324.

Vanhatalo S, Kaila K. Development of neonatal EEG activity: from phenomenology to physiology. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 471-478.

Vinci C. Male chick culling. European Parliamentary Research Service: Brüssel, Belgien, 2022.

Von Blumröder D, Tönhardt H. Influence of long-term changes in incubation temperature on catecholamine levels in plasma of chicken embryos (*Gallus gallus* f. *domestica*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; 131: 701-711.

Walusinski O. Fetal yawning. *Front Neurol Neurosci* 2010; 28: 32-41.

Wan Q, Pang SF. Segmental, coronal and subcellular distribution of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the chicken spinal cord. *Neurosci Lett* 1994; 180: 253-256.

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. Sexing domestic chicken before hatch: a new method for in ovo gender identification. *Theriogenology* 2013; 80: 199-205.

Wess JM, Isaiah A, Watkins PV, Kanold PO. Subplate neurons are the first cortical neurons to respond to sensory stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 12602-12607.

Wiese AJ. Assessing Pain: Pain Behaviors. In: *Handbook of Veterinary Pain Management*, 3. Auflage. Gaynor JS, Muir WW 3rd, Hrsg. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby 2015; 67-97.

Wiese AJ, Yaksh TL. Nociception and Pain Mechanisms. In: *Handbook of Veterinary Pain Management*, 3. Auflage. Gaynor JS, Muir WW 3rd, Hrsg. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby 2015; 10-41.

Wild JM. The avian somatosensory system: a comparative view. In: *Sturkie's Avian Physiology*, 7. Auflage. Scanes CG, Dridi S, Hrsg. London: Academic Press 2022; 123-137.

Williams CJA, James LE, Bertelsen MF, Wang T. Analgesia for non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Physiol* 2019; 11: 75-84.

Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci* 2004; 74: 2605-2610.

Woolf CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 2011; 152: S2-S15.

Woolley SC, Gentle MJ. Physiological and behavioural responses in the hen (*Gallus domesticus*) to nociceptive stimulation. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1987; 88: 27-31.

Xie W. Assessment of Pain in Animals. In: *Animal Models of Pain*. Ma C, Zhang J-M, Hrsg. New York: Humana Press 2011; 1-21.

Yoneta H, Fukuoka S, Akiyama R, Tazawa H. Early development of cholinergic heart rate control in embryos of broiler and White Leghorn chicken. In: *New Insights into Fundamental Physiology and Peri-natal Adaptation of Domestic Fowl*. Yahav S, Tzschentke B, Hrsg. Nottingham: Nottingham University Press 2006; 1-14.

Youssef A, Berckmans D, Norton T. Non-Invasive PPG-Based System for Continuous Heart Rate Monitoring of Incubated Avian Embryo. *Sensors* 2020; 20: 4560.

Zhai XY, Atsumi S. Large dorsal horn neurons which receive inputs from numerous substance P-like immunoreactive axon terminals in the laminae I and II of the chicken spinal cord. *Neurosci Res* 1997; 28: 147-154.

Zimmerman M. Behavioural investigations of pain in animals. In: *Assessing pain in farm animals*. Duncan IJH, Molony V, Hrsg. Luxemburg: Commission of the European Communities 1986; 16-29.

XII. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinen größten Dank meiner Betreuerin und Mentorin Prof. Dr. Christine Baumgartner aussprechen, welche mir ermöglicht hat, dieses spannende und gesellschaftlich relevante Thema zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihr für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die Beantwortung jeglicher Fragen und die überaus konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ebenso gilt ein sehr großer Dank Prof. Dr. Heidrun Potschka, welche so freundlich war, die Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU zu übernehmen, sowie uns als Mitglied des wissenschaftlichen Beirats zu diesem Projekt jederzeit konstruktiv beraten hat.

Außerdem möchte ich Dr. Julia Werner und Dr. Anna Saller herzlich für die uneingeschränkte Unterstützung während des gesamten Projektes, die tägliche Beantwortung von Fragen und Vielzahl von wertvollen Korrekturen bedanken. Ein großer Dank geht auch an meine Kollegin Stephanie Süß für die jederzeit Freude bereitende Zusammenarbeit und die intensive Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Außerdem möchte ich Stefanie Fitzner herzliche dafür danken, dass sie sich die Zeit genommen hat, mir bei der Durchführung der zahlreichen Messungen zu assistieren. Weiterhin gilt ein großes Dankeschön allen Mitarbeitern des ZPF für ihre Unterstützung und Mitarbeit, insbesondere allen Tierpflegern, tiermedizinischen Fachangestellten und Auszubildenden, die ebenso maßgeblich zur Durchführung der Studie beigetragen haben. Zudem möchte ich mich für die jederzeit angenehme Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern und die großartige Arbeitsatmosphäre am ZPF bedanken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel des Projektes bedanke ich mich außerdem herzlich beim Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.

Des Weiteren möchte ich meiner gesamten Familie und meinen Freunden von ganzem Herzen danken, dass sie mir jederzeit unterstützend zur Seite standen und während dieser arbeitsintensiven Zeit immer für mich da waren. Außerdem möchte ich allen weiteren Menschen und Tieren danken, die mich während dieser Zeit inspiriert haben. Schließlich bin ich auch dankbar für die Möglichkeit, so viele Sportarten auszuüben, die immer für die nötige Abwechslung gesorgt haben.