

Nozizeption im Hühnerembryo -  
Eine Bewegungsanalyse als Indikator für  
Nozizeption *in ovo*

von

Stephanie Christina Süß

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

**Nozizeption im Hühnerembryo -  
Eine Bewegungsanalyse als Indikator für  
Nozizeption *in ovo***

von Stephanie Christina Süß  
aus Eggenfelden

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

**Korreferenten:** Univ.-Prof. Dr. Helen P. Louton

Tag der Promotion: 8. 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 III:  
Analysis of Movements  
before and after  
Application of a Noxious Stimulus**

Stephanie C. Süß<sup>1</sup>, Julia Werner<sup>1</sup>, Anna M. Saller<sup>1</sup>, Larissa Weiss<sup>1</sup>, Judith Reiser<sup>1</sup>, Janie M. Ondracek<sup>2</sup>, Yury Zablotki<sup>4,3</sup>, Sandra Kollmansperger<sup>4</sup>, Malte Anders<sup>4</sup>, Heidrun Potschka<sup>5</sup>, Benjamin Schusser<sup>6</sup>, Thomas Fenzl<sup>4,5</sup> and Christine Baumgartner<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Preclinical Research, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Bavaria, Germany

<sup>2</sup> Chair of Zoology, TUM School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, 85354 Freising, Bavaria, Germany

<sup>3</sup> Clinic for Swine, Center for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, 85764 Oberschleißheim, Bavaria, Germany

<sup>4</sup> Clinic for Anesthesiology and Intensive Care, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Bavaria, Germany

<sup>5</sup> Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Bavaria, Germany

<sup>6</sup> Reproductive Biotechnology, TUM School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, 85354 Freising, Bavaria, Germany

<sup>7</sup> Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Bavaria, Germany

\* Corresponding author: Prof. Dr. Christine Baumgartner, Christine.Baumgartner@tum.de

*Animals* **2023**, 13(18), 2859.

<https://doi.org/10.3390/ani13182859>

Received: 20 July 2023 Accepted: 7 September 2023 Published: 8 September 2023





Aus Gründen der Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.



*Meiner Familie*



*It seems to me that one of the lessons we can draw from LORENZ's work is that our science will always need naturalists and observers as well as experimenters; we must, by a balanced development of our science, make sure that we attract the greatest possible variety of talent, and certainly not discourage the man with a gift for observation.*

*Instead we should attract such men, for they are rare; we must encourage them to develop their gifts of observation and help them ask relevant questions with respect to what they have seen.*

*Niko Tinbergen*

*1907 - 1988*

*On aims and methods of ethology, 1963*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Aufbau und Entwicklung des befruchteten Hühnereis</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Hühnerembryonen in der Wissenschaft</b>	<b>6</b>
3.1	Historische und aktuelle Einordnung . . . . .	6
3.2	Systeme zur wissenschaftlichen Arbeit am Hühnerembryo . . . . .	7
3.2.1	<i>In ovo</i> Technik: Das gefensterete Hühnerei . . . . .	7
3.2.2	<i>Ex ovo</i> Technik: Das System Surrogate-Eier . . . . .	8
3.2.3	<i>Ex ovo</i> Technik: Schalenlose <i>ex ovo</i> Systeme . . . . .	9
<b>4</b>	<b>Schmerz und Nozizeption</b>	<b>11</b>
4.1	Definitionen . . . . .	11
4.1.1	Schmerz . . . . .	11
4.1.2	Nozizeption . . . . .	12
4.2	Schmerzwahrnehmung und Nozizeption bei Tieren . . . . .	13
4.2.1	Schmerzempfindungen bei Tieren . . . . .	13
4.2.2	Anatomisch - physiologische Grundlagen der Nozizeption und Schmerzwahrnehmung beim Vogel . . . . .	14
4.3	Schmerzwahrnehmung und Nozizeption bei Neonaten, Feten und Embryonen . . . . .	19
4.3.1	Schmerzempfindungen durch Neonaten, Feten und Embryo- nen - artübergreifende Betrachtungen . . . . .	19
4.3.2	Anatomisch - physiologische Voraussetzungen der Schmerz- wahrnehmung und Nozizeption bei Feten und Embryonen - artübergreifende Betrachtungen . . . . .	20
<b>5</b>	<b>Verhalten und Schmerz</b>	<b>23</b>
5.1	Verhalten adulter Vogel:	
	Haushuhn, <i>Gallus Gallus domesticus</i> . . . . .	23
5.1.1	Normverhalten . . . . .	23
5.1.2	Schmerzassoziertes Verhalten . . . . .	24
5.2	Verhalten Embryo:	
	Haushuhn <i>Gallus Gallus domesticus</i> . . . . .	29
5.2.1	Normverhalten ( <i>in ovo</i> ) . . . . .	29
5.2.2	Schmerzassoziertes Verhalten . . . . .	32



<b>6 Methoden der Verhaltensforschung</b>	<b>34</b>
6.1 Die Definition von „Verhalten“ . . . . .	34
6.2 Die Entwicklung der Verhaltensforschung . . . . .	34
6.3 Verhaltensbeobachtung durch den Menschen . . . . .	35
6.4 Verhaltensbeobachtung durch Technologie . . . . .	38
6.4.1 „Artificial intelligence“ in der Verhaltensforschung . . . . .	38
6.4.2 DeepLabCut . . . . .	39
<b>7 Publierte Studienergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>8 Erweiterte Studienergebnisse</b>	<b>57</b>
8.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Bewegungen . . . . .	57
8.2 Vergleich zwischen Beobachtern . . . . .	59
<b>9 Erweiterte Diskussion</b>	<b>62</b>
9.1 Einflussfaktoren auf das Verhalten in der <i>Baseline</i> . . . . .	62
9.2 Parameter für Nozizeption und Schmerz beim Hühnerembryo . . . . .	64
9.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede . . . . .	68
9.4 Vergleich der Analyse: Software und Mensch . . . . .	71
9.5 Vergleich zwischen Beobachtern . . . . .	72
9.6 Komplementäre Studien und Ausblick . . . . .	75
<b>10 Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>11 Summary</b>	<b>80</b>
<b>12 Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>13 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>14 Tabellenverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>15 Anhang</b>	<b>105</b>
15.1 Supplemente der Publikation . . . . .	105
15.2 Supplemente zum Vergleich zwischen den Beobachtern . . . . .	142
<b>16 Danksagung</b>	<b>146</b>

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
§	Paragraph
%	Prozent
AI	artificial intelligence
ANN	artificial neural networks
AVMA	American Veterinary Medical Association
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
BVerwG	Bundesverwaltungsgericht
CAM	Chorioallantoismembran
DCNN	deep convolutional neural networks
DL	deep learning
DLC	DeepLabCut
DVR	dorsal ventricular bridge

ED	embryonic day
EEG	Elektroenzephalographie / Elektroenzephalogramm
EMG	Elektromyographie
IaOR	Intra-observer-reliability
IASP	International Association on the Study of Pain
IeOR	Inter-observer-reliability
ML	machine learning
n	Anzahl/Tierzahl
p	Signifikanzwert
PNS	Peripheres Nervensystem
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

Im Jahr 2022 wurde in Deutschland das Kükentöten verboten [1, 2]. Der Begriff „Kükentöten“ beschreibt die bis dahin gängige Praxis in der industriellen Hühnerproduktion, männliche Eintagsküken zu töten [2]. Für die Eierproduktion kann nur die weibliche Nachzucht des Bestandes verwendet werden, für die männliche Nachzucht gibt es keine wirtschaftlich rentable Verwendung [2, 3]. Aufgrund der speziellen genetischen Disposition dieser Legelinien ist auch eine separate Mast der Hähne unwirtschaftlich, u.a. aufgrund zu geringer Gewichtszunahmen [2]. Männliche Eintagsküken wurden daher unmittelbar nach der Geschlechtsbestimmung in großer Zahl getötet [2]. Die mangelnde Wirtschaftlichkeit wurde jedoch langfristig nicht mehr als vernünftiger Grund für die Tötung der Tiere entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz anerkannt [2, 3]. Dies führte letztlich zum gesetzlichen Verbot des Kükentötens [1, 2].

Es existieren inzwischen Alternativen [2]. Sie beinhalten neben beispielsweise der Bruderhahnaufzucht den Einsatz neuer Techniken, welche noch im Ei eine Geschlechtsbestimmung der Embryonen ermöglichen [2]. So können noch vor Schlupf Eier mit männlichen Embryonen aussortiert werden [2]. Eine Variante hierfür ist die Messung von Hormonen in der Allantoisflüssigkeit, womit bereits an Bruttag 9 zuverlässig weibliche und männliche Embryonen unterschieden werden können [4]. In der Folge der Entwicklungen entstand eine Diskussion, ob ein Gesetz, vergleichbar dem Verbot des Kükentötens, auch für entsprechend weit entwickelte Hühnerembryonen erforderlich wäre. Die Fähigkeit des Embryos zur Schmerzwahrnehmung oder Nozizeption wurde als entscheidender Faktor gewählt, um den Entwicklungsstand festzulegen, ab dem ein entsprechendes Gesetz greifen sollte [2]. Die Literatur zu diesem Thema bestand bis dahin aus verschiedenen Studien, deren Konsens war, dass Nozizeption und Schmerz vor dem 7. Bruttag ausgeschlossen werden können, ab dem 14. Bruttag jedoch wahrscheinlich sind [5]. Basierend hierauf wurde ein Gesetzentwurf zur Änderung des deutschen Tierschutzgesetzes entwickelt, welcher das Töten der männlichen Hühnerembryonen nach Anwendung einer *in ovo* Geschlechtsbestimmungsmethode ab Bruttag 7 verbietet [2]. Die Da-

tenlage erschien jedoch nicht ausreichend fundiert, um den 7. Bruttag als Grenze zu rechtfertigen [2]. Ein Entscheidungshilfe-Vorhaben mit dem Ziel, den Zeitraum, in welchem Hühnerembryonen die Fähigkeit zur Nozizeption entwickeln und potenziell aversive Sinneseindrücke als Schmerzen empfunden werden können, einzugrenzen, wurde vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) in Auftrag gegeben [2]. Die dreiteilige Studie, durchgeführt von der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Christine Baumgartner, diente als wissenschaftliche Basis zur Empfehlung eines angemessenen Bruttages für den Gesetzentwurf [2, 6].

Im Rahmen eines explorativen Ansatzes wurde in der vorliegenden Arbeit das Ziel verfolgt, Bewegungen der Hühnerembryonen vor und nach einem noxischen Reiz zu untersuchen [7]. Für die Analyse wurden sowohl die klassische Methode der menschlichen Beobachtung als auch moderne Technik aus dem Bereich der künstlichen Intelligenz eingesetzt [7]. Die Intention bestand darin, Reaktionen auf einen noxischen Reiz in Form von möglicherweise als nozifensiv zu interpretierenden Bewegungen oder Abweichungen vom Normverhalten beobachten zu können [7]. Beides könnten Hinweise auf funktionierende Nozizeption und mögliches Schmerzempfinden sein [7].

Diese Untersuchungen stellen den dritten Teil der komplementären Studie dar, deren Ergebnisse unter den Titeln „Nociception in chicken embryos“ Teil I bis III veröffentlicht wurden [7–9]. Für Teil I wurden Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen durchgeführt; für Teil II wurden Elektroenzephalogramme der Hühnerembryonen aufgezeichnet [7–9].

Basierend auf den Ergebnissen der dreiteiligen Studie kam es zu einer Anpassung des Gesetzentwurfs [2]. Die Grenze, bis zu welchem Bruttag das Töten der Hühnerembryonen erlaubt ist, konnte auf inklusive Bruttag 12 angehoben werden, da Nozizeption und Schmerzempfinden bis Bruttag 13 ausgeschlossen werden können [2, 10]. Der angepasste Gesetzentwurf wurde angenommen und so trat am 1. Januar 2024 eine Änderung des deutschen Tierschutzgesetzes in Kraft, die festlegt, dass Hühnerembryonen ab dem 13. Bruttag in Folge von *in ovo* Geschlechtsbestimmungsverfahren nicht mehr getötet werden dürfen [1, 10].

## 2. Aufbau und Entwicklung des befruchteten Hühnereis

Vögel sind ausnahmslos ovipar, das heißt, sie reproduzieren sich durch Eiablage; vivipare Arten sind nicht bekannt [11]. Abgesehen von Sauerstoff umfasst ein befruchtetes Vogelei sämtliche essentiellen Komponenten, die für die embryonale Entwicklung bis zum erfolgreichen Schlupf benötigt werden [11]. Die Entwicklung des Embryos im Ei bis zum Schlupf umfasst 20 - 21 Tage [12–14]. Im folgenden Kapitel soll grundlegend der Aufbau eines Eis anhand eines Hühnereis nach Befruchtung und Eiablage, aber vor Beginn der Inkubation, erläutert werden.

Die äußerste Schicht des Hühnereis bildet die sogenannte Cutikula, eine Wachsschicht, die als antimikrobielle Barriere gegen äußere Einflüsse dient [11, 15]. Darunter liegt die harte Kalkschale, die als mechanischer Schutz fungiert [11, 15]. Gleichzeitig dient sie als Kalziumquelle für den wachsenden Embryo und ist sauerstoffdurchlässig, um eine angemessene Versorgung zu gewährleisten [11, 15]. In Richtung des Inneren des Eis folgt dann die Eihaut, auch als Schalenmembran bezeichnet, die in eine innere und eine äußere Schalenhaut unterteilt wird und größtenteils eng an der Kalkschale anliegt [11, 15, 16]. Nur im Bereich des stumpfen Pols trennen sich das äußere und das innere Blatt der Eihaut, was zur Bildung der Luftkammer führt [11, 15, 16]. Das Ei enthält Albumen, das allgemein als Eiweiß oder Eiklar bekannt ist [11, 15, 16]. Es fungiert sowohl als antimikrobieller Schutz als auch als Nahrungsquelle für den Embryo und wird bis in etwa zum 18. Entwicklungstag aufgebraucht [13, 15]. Das Albumen liegt in unterschiedlichen Konsistenzen vor, die konzentrisch um die Dotterkugel herum angeordnet sind [11, 16]. Es besteht zu bis zu 90% aus Wasser und enthält zudem verschiedene Proteine [11, 15, 16]. Im Albumen, sowohl in Richtung des stumpfen als auch des spitzen Pols des Eis lassen sich die Chalazen, auch als Hagelschnüre bezeichnet, identifizieren [11, 15, 16]. Sie bestehen aus spiralig gedrehten Proteinen des Albumens [11, 15]. Der Eidotter, welcher als primäre Nährstoffquelle für den Embryo dient, ist von der zweiblättrigen vitellinen Membran oder auch Dotterhaut umge-

ben, die seine Integrität gewährleistet [11, 15, 16]. Die Chalazen haften an dieser Membran an und stabilisieren dadurch die Dotterkugel [11, 15]. Eine Rotation der Dotterkugel um ihre eigene Längsachse ist jedoch möglich [15]. In einem horizontal liegenden Ei wird der Dotter aufgrund seiner geringeren Dichte im Bereich des Blastoderms stets so ausbalanciert, dass die Keimscheibe, das Blastoderm, nach oben zeigt [15]. Innerhalb der Dotterkugel kann zwischen weißen und gelben Dotter unterschieden werden [11, 15]. Der sogenannte weiße Dotter befindet sich im Bereich um und unterhalb des Blastoderms und wird auch als Panderscher Kern bezeichnet [11, 15]. Von hier aus reicht die sogenannte Latebra, ein Strang an weißem Dotter in das Zentrum der Dotterkugel hinein [11, 15]. Es wird von einigen Autoren vermutet, dass die Latebra ebenfalls dazu dient, den Dotter so auszurichten, dass das Blastoderm stets nach oben gerichtet ist [16]. In der übrigen Dotterkugel ist ein konzentrisches Schichtsystem aus gelbem und weißem Dotter zu erkennen, wobei einige Autoren annehmen, dass diese Schichtung mit der Ernährung der Henne korreliert [11, 15]. Im Wesentlichen besteht der Dotter vor allem aus Lipiden und Proteinen in einer wässrigen Lösung [11].

Im Verlauf der Inkubation kommt es aufgrund des Wachstums des Embryos und der Ausdehnung der verschiedenen Fruchthüllen und ihres Inhalts zu Lageveränderungen im Ei [17]. Die Fruchthüllen sind essenziell für die Entwicklung des Embryos [17]. Während der gesamten Entwicklungszeit sind die Fruchthüllen mit dem Embryo verbunden [17]. Sie stellen jedoch keinen Bestandteil des eigentlichen embryonalen Körpers dar [17]. Zum Zeitpunkt des Schlupfes sind sie entweder bereits absorbiert oder werden zurückgelassen [17]. Am Dottersack, der von der vitellinen Membran bzw. Dotterhaut umgeben ist, bildet sich ab dem zweiten Bebrütungstag der sogenannte Dotterkreislauf aus [13, 17]. Durch die Verbindung der gebildeten Gefäße (Arteriae und Venae vitellinae, Sinus terminalis) mit dem sich entwickelnden Herz wird der Dotterkreislauf bereits im Laufe des zweiten Bebrütungstag funktionsfähig [13]. Seine Funktion besteht darin, Nährstoffe aus dem Dotter in den Embryo zu transportieren [13]. Der vaskularisierte Bereich des Dottersacks wird als Area vasculosa bezeichnet in Abgrenzung zur Area vitellina [17]. Diese beiden Bereiche sind durch den Sinus terminalis, ein Blutgefäß, das am Rand der Area vasculosa verläuft, deutlich voneinander abgrenzbar [17]. Etwa ab der Mitte der Inkubationszeit gelangt der Dotter über den Dottersackstiel direkt in den embryonalen Darmtrakt und wird dort enzymatisch abgebaut [13]. Etwa zwei Tage vor dem Schlupf wird der Dottersack vermutlich durch die Kontraktion von Muskeln im abdominalen Bereich des Embryos in diesen hinein verlagert [13, 17]. Er dient somit noch bis nach dem Schlupf als Nahrungsquelle [13, 17].

Bei Vögeln entwickelt sich das Amnion als Faltamnion [13]. An beiden Seiten des Embryos bildet sich eine Falte, deren inneres Blatt schließlich das Amnion bildet, während das äußere Blatt das Chorion bildet [13, 17]. Der Raum, der zwischen den beiden Strukturen entsteht, wird als extraembryonales Coelom bezeichnet [17]. Die erhobenen Falten verschmelzen miteinander, wobei das äußere Blatt (Chorion) und das innere Blatt (Amnion) voneinander getrennt werden [17, 18]. An einer Stelle, bleiben die beiden Blätter jedoch miteinander verbunden und bilden die seroamniotische Platte [17]. Diese Platte bleibt zunächst verschlossen [17]. Im letzten Drittel der Inkubation perforiert diese Platte und bildet einen Verbindungskanal zum Inneren des Amnions [13, 17]. Über diesen Kanal kann Albumen in das Amnion gelangen und vom Embryo aufgenommen werden [13, 17, 19].

Das Amnion bildet nach dem Verschluss der Falten einen Hohlraum, der mit Fruchtwasser gefüllt ist [13]. Dieser Raum ermöglicht die Entwicklung des Embryos in einer geschützten Umgebung und bewahrt ihn vor Dehydratation [13, 17]. Das Amnion ist weder innerviert noch vaskularisiert, enthält jedoch Muskelfasern [17]. Ab dem 5. Entwicklungstag führen Kontraktionen dieser Muskelfasern dazu, dass sich die Amnionflüssigkeit um den Embryo bewegt [17]. Es wird angenommen, dass die Kontraktionen und die Bewegung der Amnionflüssigkeit bis zum 12. Bebrütungstag dafür sorgen, Adhäsionen des embryonalen Gewebes zu verhindern [17]. Das Chorion, entstanden durch das äußere Blatt der Falte, liegt zunächst am Albumen an und später, als äußerste Struktur der Fruchthüllen, direkt an der Eihaut [13]. Die Allantois wird oft als die embryonale Harnblase bezeichnet, da sich hier ab etwa dem vierten Tag der Entwicklung die Abfallprodukte des embryonalen Stoffwechsels ansammeln [13, 17]. Ab dem 3. Bebrütungstag beginnt die Allantois sich zu entwickeln und füllt zunehmend den Bereich des extraembryonalen Coeloms aus [17]. Während dieser Entwicklung liegt die Allantois direkt am Chorion an, und schließlich verwachsen Chorion und Allantois miteinander, um die Chorioallantoismembran (CAM) zu bilden [13, 17]. Die CAM ist von Gefäßen durchzogen und dieser sogenannte Allantoiskreislauf wird ab dem 5. Bebrütungstag funktionsfähig [13, 17]. Am 16. Bruttag erstreckt sich die CAM nahezu über den gesamten Dottersack und weist an einigen Stellen auch Verbindungen zum Dotter auf, wobei jedoch keine direkte Verbindung zum Dotterkreislauf besteht [17, 20]. Der Allantoiskreislauf übernimmt die Aufgaben des Gasaustauschs und der Versorgung des Embryos mit Nährstoffen [13, 17].



# 3. Hühnerembryonen in der Wissenschaft

## 3.1 Historische und aktuelle Einordnung

Hühnerembryonen sind seit langem ein beliebtes Modell in verschiedenen Forschungsbereichen [21–24]. Sie werden in Untersuchungen zur Embryologie, Onkologie, Kardiologie, Epigenetik, Immunologie und vielen weiteren Disziplinen eingesetzt [21–23, 25]. Eine Übersicht über die Verwendung von Hühnerembryonen in der Wissenschaft und die daraus erfolgten Errungenschaften erfolgte unter anderem 2004 durch Wolpert und 2014 durch Kain et al. [24, 26]. Beide Veröffentlichungen verdeutlichen die Relevanz des befruchteten Hühnereis und des Hühnerembryos für die Forschung seit Jahrhunderten [24, 26].

Die anhaltende Popularität von Hühnerembryonen als Forschungsmodell basiert auf verschiedenen Gründen, dargestellt in Abbildung 3.1. Mit der Zeit haben sich diverse Systeme etabliert, die den benötigten Zugang zum Inneren des Eis und zum Hühnerembryo für wissenschaftliche Experimente gewährleisten [22, 24, 28, 29]. Man unterscheidet hierbei „*in ovo*“ und „*ex ovo*“ Systeme (Tabelle 3.1) [30, 31]. In den dann folgenden Abschnitten sollen beispielhaft drei in der Forschung geläufige Systeme vorgestellt werden.

Tabelle 3.1: Definition *in ovo* und *ex ovo* [30, 31].

<i>in ovo</i>	<i>ex ovo</i>
Entwicklung des Embryos in der eigenen Schale	Entwicklung des Embryos außerhalb der eigenen Schale (Surrogate, schalenlose Entwicklung)

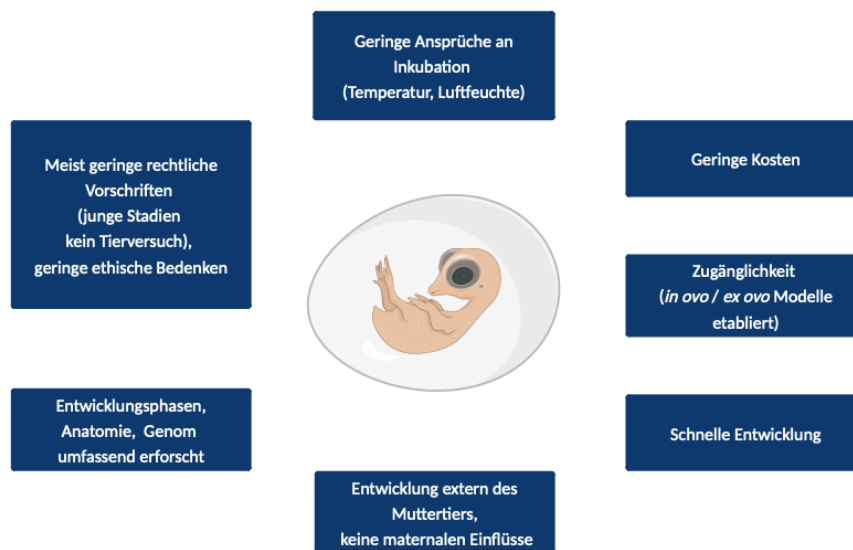


Abbildung 3.1: Der Hühnerembryo in der Forschung. Gründe für die Popularität von Hühnerembryonen in der Wissenschaft [14, 22–24, 27]. Grafik erstellt mit Biorender.com

## 3.2 Systeme zur wissenschaftlichen Arbeit am Hühnerembryo

### 3.2.1 *In ovo* Technik: Das gefensterete Hühnerei

Das Erstellen eines wiederverschließbaren Fensters in der Schale eines Hühnereis hat eine lange Geschichte [29]. Einer der frühesten Berichte dieser Methode stammt von dem Wissenschaftler Nikolaus von Béguelin um ca. 1750 [29]. Er verschloss die Öffnung in der Eischale, durch die er den Embryo beobachtete, außerhalb der Beobachtungszeiten mit einem zusätzlichen Stück Eischale [29]. Inzwischen existieren in der Literatur mehrere Protokolle zur Etablierung einer Öffnung in der Eischale, welche sich in ihrem Vorgehen geringgradig unterscheiden [32–34]. Das übergeordnete Ziel jeder Methode besteht jedoch darin, die Eischale zu öffnen, ohne den Hühnerembryo zu beeinträchtigen oder zu schädigen [31, 34]. Das Ergebnis entspricht dem Einfügen eines temporären oder dauerhaften (Sicht)fensters in die Eischale [32, 34]. Eine Inkubation bis zum gewünschten Entwicklungstag ist im Anschluss möglich [32].

## **Fenestrierung**

Die Beschreibung der Fenestrierung eines Hühnereis mit anschließendem Verschluss zum Einfügen eines dauerhaften Fensters erfolgt in Anlehnung an die Technik von Spurlin III und Lwigale [32]. Bis zum dritten Inkubationstag wird der Hühnerembryo in horizontaler Lage bebrütet [32]. Der dritte Bruttag ist hierbei wichtig, da sich im weiteren Entwicklungsverlauf der Embryo bzw. seine extraembryonalen Hüllen an die Schale anheften und ein atraumatisches Eröffnen der Eischale nicht mehr möglich ist [35]. Es wird ein kleines Loch in der Eischale erzeugt, durch das Albumen abgezogen werden kann [32]. Im Anschluss wird die Eischale vorsichtig entlang der longitudinalen Achse des Eis entfernt, bis ein ausreichend großes Fenster entstanden ist, in welchem die embryonalen Anlagen sichtbar sind [32]. Vor Verschluss mit transparentem Klebeband werden wenige Tropfen Ringer-Lösung, welche mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, in das Ei gegeben [32]. Im Anschluss kann das Ei, nun in horizontaler Lage, wieder in den Inkubator verbracht werden und bis zum gewünschten Bruttag weiter inkubiert werden [32].

### **3.2.2 Ex ovo Technik: Das System Surrogate-Eier**

Im Kontext des Themas dieser Arbeit bezieht sich der Begriff „Surrogate“ auf die Inkubation eines Hühnerembryos in einer fremden (arteigenen oder artfremden) Eischale, wie beispielsweise die Übertragung eines Hühnerembryos im frühen Stadium in ein leeres Putenei [36]. Da der Hühnerembryo hierbei seiner eigenen Schale entnommen wird, fällt diese Technik in den Bereich der *ex ovo* Techniken [30]. Die Idee, ein befruchtetes Hühnerei außerhalb seiner natürlichen Schale zu entwickeln, existiert bereits seit vielen Jahren [37]. Jedoch wird das von Perry 1988 veröffentlichte System als die erste erfolgreiche Methode angesehen, bei der sich ein Hühnerembryo mithilfe von drei externen Systemen (System I - III) von der Befruchtung bis zum Schlupf außerhalb seiner eigenen Eischale (*ex ovo*) entwickeln konnte [30, 36, 37]. Basierend auf Perrys Ideen für die Systeme II (Bruttage 1-4) und III (weitere Entwicklung bis zum Schlupf) gibt es inzwischen modifizierte Versionen [36, 38, 39]. Ein häufig verwendetes Protokoll zur Herstellung von Surrogate-Hühnereiern wurde 2005 von Borwornpinyo et al. veröffentlicht und soll im Folgenden in seinen Grundzügen dargestellt werden [36].

#### **Vorbereitung der Empfänger-Eischalen**

Zur Vorbereitung der Empfänger-Eischalen werden frisch gelegte Hühnereier (*Gallus gallus domesticus*) sowie Puteneier (*Meleagris gallopavo*) verwendet [36]. Am

spitzen Pol der Eier wird manuell eine runde Öffnung erzeugt [36]. Der gesamte Inhalt wird entfernt und die Schalen sowohl innen als auch außen mit destilliertem Wasser gespült [36].

#### **Surrogatkultur System II**

Als Spendereier werden ausschließlich frisch gelegte, befruchtete Hühnereier gewählt [36]. Diese Spendereier werden geöffnet und der gesamte Inhalt des befruchteten Hühnereis wird in eine Empfängerschale überführt [36]. Diese wird dann mit Albumin anderer frisch gelegter Eier aufgefüllt [36]. Die Öffnung der Empfängerschale wird anschließend mit einem Stück Folie verschlossen [36]. Diese System-II-Surrogate-Eier können dann regulär inkubiert werden [36].

#### **Surrogatkultur System III**

Die Überführung der Hühnerembryonen in die Puteneischalen erfolgt am 3. Bruttag [36, 37]. Diese Technik gilt als besonders anspruchsvoll [37, 40]. Zunächst werden alle System-II-Surrogate-Eier entlang ihrer longitudinalen Achse aufgerichtet, wodurch sich der Embryo nahe der Öffnung befindet [36]. Die Ränder der Öffnungen beider Eischalen werden aneinander gelegt und der gesamte Inhalt des Hühnereis zügig, aber vorsichtig in die Puteneischale umgefüllt [36]. Nach der Übertragung befindet sich der Embryo oben schwimmend in der Puteneischale [36]. Die Puteneischale und der Hühnerembryo werden zusammen nun als System-III-Surrogate-Ei bezeichnet [36]. Das System-III-Surrogate-Ei wird erneut mittels Folie verschlossen und kann weiter inkubiert werden bis zum Schlupf [36].

#### **3.2.3 Ex ovo Technik: Schalenlose ex ovo Systeme**

Vor allem um die Zugänglichkeit zu älteren Entwicklungsstadien zu verbessern, wurden schalenlose *ex ovo* Methoden für Hühnerembryonen entwickelt [31, 32, 41]. Diese Systeme basieren auf der Entnahme des Embryos aus seiner natürlichen Umgebung, der Eischale, mitsamt Dotter und Albumin, ähnlich einem Surrogate-System [31]. Allerdings erfolgt die Überführung in ein vollständig künstliches System, oft unter Verwendung von transparentem Glas oder Plastik, um die Sichtbarkeit des Embryos zu gewährleisten [31]. Auch für vollständig schalenlose *ex ovo* Systeme gibt es verschiedene Techniken mit unterschiedlichen Modifikationen [42–45]. Im Folgenden wird die Methode nach Tahara in ihren Grundzügen dargestellt [42]. Diese einfache Methode der schalenlosen Entwicklung gilt als eine der ersten, bei

der der Hühnerembryo am Ende der artifiziellen Inkubation in der Lage ist, zu schlüpfen [30, 42].

#### **Kulturgefäße**

Ein Plastikbecher wird als Kulturgefäß verwendet [42]. Seitlich wird ein Loch gebohrt, das als Sauerstoffzufuhr dient und mittels eines Filters wieder geschlossen wird [42]. Anschließend wird eine wässrige Lösung von 0,01 % Benzalkoniumchlorid hineingegeben [42]. Eine Folie wird in eine konkave Form gebracht und als künstliche Halterung oben im Kulturgefäß installiert [42]. Das Gefäß wird am Ende mit einem Plastikdeckel abgedeckt [42].

#### **Embryokultur**

Befruchtete Hühnereier werden über einen Zeitraum von 55-56 Stunden in einem Inkubator vorinkubiert [42]. Zur Vorbereitung der Embryokultur werden Calciumlactat-Pentahydrat-Pulver und steriles destilliertes Wasser zu den Kulturgefäßen in die durch die Folie geschaffene Mulde hinzugefügt [42]. Am 3. Bebrütungs- tag wird jedes Ei eröffnet und der gesamte Eiinhalt in die Mulde der Plastikfolie überführt [42]. Am oberen Bereich der Folie, wo keine Berührungspunkte mit dem Embryo bestehen, werden Belüftungslöcher erstellt [42]. Das Kulturgefäß wird mit einem Plastikdeckel abgedeckt, um die Luftfeuchtigkeit im Inneren des Gefäßes zu erhalten [42]. Anschließend kann es in einem regulären Inkubator zur Inkubation aufgestellt werden [42]. Mit dieser Methode können Hühnerembryonen am Ende der Inkubationszeit erfolgreich schlüpfen [30, 42]. Die beschriebene Methode setzt voraus, dass in den ersten drei Tagen der Entwicklung eine reguläre Inkubation bei geschlossenem Ei stattfindet [42, 45]. Dunn präsentierte 2023 eine Modifikation eines schalenlosen *ex ovo* Systems, das bereits ab dem Beginn der Bebrütung, ohne vorangehende Inkubation, umgesetzt werden kann und zum Schlupf des Embryos führt [45].

# 4. Schmerz und Nozizeption

## 4.1 Definitionen

Eine exakte Unterscheidung von Schmerz und Nozizeption ist essentiell [46]. Während der Begriff „Schmerz“ die subjektive und bewusste Wahrnehmung eines potenziell noxischen Reizes beschreibt, deckt der Begriff „Nozizeption“ die Vorgänge der Reizweiterleitung im Körper ab, welche als Reaktion auf einen noxischen Reiz im Nervensystem eines Organismus ablaufen [46–48]. Im Folgenden sollen beide Begriffe detailliert erläutert werden.

### 4.1.1 Schmerz

Die IASP (International Association on the Study of Pain) hat im Jahr 2021 ihre Definition von Schmerz umfassend erneuert und mittels zusätzlicher Anmerkungen die Definition um relevante Details erweitert [46]. Zusammengefasst wird Schmerz nun als ein „aversives sensorisches und emotionales Erlebnis, das typischerweise durch eine tatsächliche oder potenzielle Gewebeverletzung verursacht wird“ beschrieben [46].

In den zusätzlichen Anmerkungen wird u.a. verdeutlicht, dass Schmerzen eine subjektive Wahrnehmung des Individuums sind [46]. Diese Wahrnehmung ist von verschiedenen Faktoren beeinflussbar und wird im Laufe des Lebens erlernt [46]. Es ist auch noch einmal deutlich herauszustellen, dass Schmerz mit einer bewussten Wahrnehmung einhergeht [46]. Ein für die Veterinärmedizin relevanter Zusatz der Definition besteht darin, dass der verbale Ausdruck von Schmerzen nur eine mögliche Variante ist, Schmerz auszudrücken [46]. Im Gegenzug impliziert dies, dass auch wenn keine verbale Kommunikation einer Schmerzempfindung stattfindet, so wie dies im Tierbereich häufig der Fall ist, trotzdem die Möglichkeit einer Schmerzempfindung bedacht werden muss [46, 49]. Des Weiteren wird explizit darauf hingewiesen, dass Schmerz und Nozizeption zwei voneinander zu unterscheidende Konzepte sind [46].

Eine breiter gefasste Definition von Schmerz, die von Zimmermann bereits 1984 veröffentlicht wurde, betonte bereits damals die nichtverbale Ausdrucksweise von Schmerzen bei Tieren [50, 51]. In dieser erweiterten Definition wird Schmerz als eine Erfahrung beschrieben, die bei Tieren Schutzreaktionen sowohl motorischer als auch vegetativer Art auslösen kann [50, 51]. Außerdem kann die Schmerzerfahrung zu Vermeidungsverhalten und Veränderungen im speziesspezifischen Verhalten führen [50, 51].

Es existieren verschiedene Untergliederungen für verschiedene Arten von Schmerzen [52, 53]. Eine Möglichkeit der Klassifikation ist die Einteilung in somatischen und viszeralen Schmerz, wobei die Übergänge fließend sein können [52, 53]. Somatischer Schmerz entsteht oberflächlich durch externe Noxen, welche die entsprechenden Nozizeptoren aktivieren, beispielsweise bei mechanischer Einwirkung auf die Haut [52, 53]. Viszeraler Schmerz, auch als Eingeweideschmerz bezeichnet, kann u.a. durch Entzündungsreaktionen an inneren Organen hervorgerufen werden [52, 53]. Eine Mischform stellt der Tiefenschmerz dar, der Schmerzen in tiefer gelegenen Anteilen, wie etwa in den Muskeln, beschreibt [53]. Darüber hinaus ist es möglich, neuropathischen Schmerz abzugrenzen. Diese Art von Schmerz wird durch Schäden oder Erkrankungen des somatosensorischen Systems hervorgerufen [46]. Der Schmerz kann sich dabei an Lokalisationen manifestieren, welche nicht dem Ort der Schädigung entsprechen und auch selbst keine Schäden aufweist [46]. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Phantomschmerz in amputierten Gliedmaßen [46].

### 4.1.2 Nozizeption

Im Gegensatz zu Schmerz bezieht sich der Begriff Nozizeption ausschließlich auf die neurologischen Vorgänge im Körper, welche durch einen noxischen Reiz ausgelöst werden [46]. Konkreter ausgedrückt handelt es sich um die Kodierung und Verarbeitung eines noxischen Reizes auf dem Niveau des peripheren (PNS) und zentralen (ZNS) Nervensystems unter Beteiligung sensorischer und motorischer Systeme [54, 55].

## 4.2 Schmerzwahrnehmung und Nozizeption bei Tieren

### 4.2.1 Schmerzempfindungen bei Tieren

Bereits beim Menschen ist Schmerz eine Empfindung, die nur schwer messbar gemacht werden kann [49, 56]. Zumeist beruht eine Einschätzung daher auf dem subjektiven Empfinden der Person, welche dies verbal kommunizieren kann [56]. Da diese Art der Selbstauskunft durch Tiere nicht möglich ist, ist die verlässliche Feststellung eines Schmerzerlebnisses eines Tieres mit Herausforderungen verbunden [49]. Über lange Zeit hinweg wurde kontrovers über die Fähigkeit von Tieren zur Empfindung von Schmerz diskutiert [49, 57]. In historischen Schriften finden sich philosophische Betrachtungen, unter den bekanntesten die Schriften von Descartes oder Aristoteles, mit einer Degradierung von Tieren zu maschinenähnlichen Konstruktionen ohne Emotionen oder moralischen Status [58]. Inzwischen wird generell angenommen, dass Tiere, vor allem Säugetiere, Schmerzen ähnlich wahrnehmen wie Menschen [49]. Diese Annahme basiert unter anderem auch darauf, dass physiologische Vorgänge und anatomische Strukturen, welche im Menschen für die Weiterleitung und Verarbeitung noxischer Reize notwendig sind, in ähnlicher oder vergleichbarer Weise bei Tieren vorhanden sind [49]. Le Neindre et al. evaluierten 2017 verschiedene Studien und kamen zusätzlich zu dem Schluss, dass in Säugetieren artübergreifend einige Regionen des Gehirns konstant an der Prozessierung von Schmerz beteiligt sind: anteriorer cingulärer Cortex, vordere Inselrinde, somatosensorischer Cortex, präfrontaler Cortex, Thalamus [47]. Auch für nicht Säugetiere - Vögel, Fische, Reptilien, Amphibien - wurde und wird die Möglichkeit Schmerz zu empfinden diskutiert [47, 49].

Die Tatsache, dass äußerlich erkennbare Anzeichen für Schmerzen im Vogel nur sehr gering ausgeprägt sind, führte lange zu Zweifeln, ob Vögel tatsächlich zur Schmerzempfindung in der Lage sind [49]. Es wird jedoch inzwischen allgemein angenommen, dass Vögel ein Schmerzempfinden haben, das dem der Säugetiere vergleichbar ist [59–61]. Allerdings gibt es insbesondere im anatomischen Aufbau des Gehirns, wo die Wahrnehmung eines noxischen Reizes als Schmerz erfolgt, Unterschiede zu Säugetieren [59, 60, 62].



### 4.2.2 Anatomisch - physiologische Grundlagen der Nozizeption und Schmerzwahrnehmung beim Vogel

Als Antwort auf einen noxischen Reiz wird in einem tierischen Organismus eine Kaskade in Gang gesetzt, die den kodierten Reiz über Nervenfasern bis in das Gehirn weiterleitet [54, 60, 63]. Dort wird der Reiz schließlich verarbeitet und als Schmerz wahrgenommen [54, 60, 63]. Obwohl Vögel einige anatomische und physiologische Besonderheiten aufweisen, gehen Forscher aktuell davon aus, dass die grundsätzlichen neurophysiologischen Abläufe bis hin zur Schmerzwahrnehmung mit der Situation im Säugetier vergleichbar sind [60].

Die Reizverarbeitung lässt sich in folgende Schritte unterteilen [54, 59, 60]:

- Transduktion
- Transmission
- Zentrale Integration und Modulation
- Projektion
- Perzeption und Prozessierung

#### Transduktion und Transmission

Bei Auftreten eines noxischen Reizes werden sogenannte Nozizeptoren des peripheren Nervensystems aktiviert und der Reiz in ein elektrisches Signal, ein sogenanntes Aktionspotenzial, umgewandelt [54, 55]. Diese Kodierung des Reizes wird als Transduktion bezeichnet [54]. Als Nozizeptoren bezeichnet man periphere Axone primär afferenter Neuronen, deren Nervenenden frei in verschiedenen Geweben des Körpers (z.B. Haut, Muskulatur) vorliegen [55, 64]. Nozizeptoren haben, anders als andere primär afferente Neuronen (z.B. für nicht noxische Berührungen), einen Schwellenwert, welcher überschritten werden muss um eine Reaktion hervorzurufen [65]. Diese benötigte Intensität führt dazu, dass Nozizeptoren physiologischerweise nur ab einer potenziell schädlichen Intensität des Reizes aktiviert werden [65].

In Vögeln wurden bisher verschiedene Klassen an Nozizeptoren nachgewiesen [66, 67]:

- Hochschwellige polymodale Nozizeptoren  
(mechanothermisch, mechanochemisch)
- Mechanische Nozizeptoren
- Thermische Nozizeptoren

Die hochschwelligen Nozizeptoren sind polymodal [55, 61, 68]. Sie können auf verschiedene Arten der Schädigung reagieren, das heißt sowohl auf mechanische wie auch auf thermische respektive chemische Schädigungen [55, 61, 68]. Mechanische und thermische Nozizeptoren hingegen reagieren ausschließlich auf entsprechende mechanische respektive thermische Schädigungen [55, 66, 69]. Besonderheiten weisen Vögel im Bereich ihrer Sensitivität bezüglich Temperatur und chemischer Irritationen auf [59, 60]. Capsaicin, bekannt als starkes chemisches Irritans beim Säugetier, wird von Vögeln nicht als chemische Noxe wahrgenommen [60]. Im Bereich der thermischen Noxen liegen die Schwellenwerte der Temperaturen, die als schädigend wahrgenommen werden, höher als bei Säugetieren [68]. Dies lässt sich möglicherweise auf die im Allgemeinen höhere Körpertemperatur von Vögeln zurückführen [60]. Nozizeptoren konnten in verschiedenen Geweben des aviären Organismus nachgewiesen werden, z.B. in Strukturen des Schnabels, in Gelenken oder der Haut [59, 60]. Das Aktionspotenzial, das den noxischen Reiz kodiert, wird ausgehend vom freien Nervenende entlang des peripheren Axons bis zum Zellkörper (Soma) des entsprechenden pseudounipolaren Neurons übertragen, welches sich im Spinalganglion (respektive im Ganglion trigeminale bei noxischen Reizen im Bereich des Gesichtsfeldes) befindet [54, 70]. Diese Weiterleitung bis in das ZNS wird als Transmission bezeichnet [54]. Das Spinalganglion liegt lateral zum Rückenmark und ein zweiter Ast bildet eine Verbindung in das Rückenmark, wo es zu einer ersten Verschaltung kommt [64].

Üblicherweise erfolgt die Unterscheidung der leitenden Fasern anhand von Durchmesser und Myelinisierungsgrad [54]. Beide Aspekte determinieren die Weiterleitungsgeschwindigkeit eines Aktionspotenzials [54]. Einerseits gibt es A $\delta$ -Fasern, welche eine geringe Myelinisierung aufweisen und als schnell leitend gelten [63, 71]. Von Menschen wird ein durch sie weitergeleiteter Reiz in der Regel als „schneller“ oder „scharfer“ Schmerz beschrieben, welcher exakt lokalisiert werden kann [48]. Andererseits gibt es C-Fasern, welche unmyelinisiert sind und eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit aufweisen [60, 63]. Reize, die über diese Fasern weitergeleitet werden, resultieren in der Empfindung eines von Menschen als „stumpf“ oder „bren-

nend“ und schwer lokalisierbar beschriebenen Schmerzes [48]. Der größere Anteil an Fasern, die in Vögeln identifiziert wurden, zählt zu den C-Fasern [60].

### **Zentrale Integration, Modulation und Projektion**

Obwohl die grundlegende Anatomie des Rückenmarks bei Vögeln im Allgemeinen der von Säugetieren ähnelt, gibt es strukturelle Unterschiede, u.a. auch zwischen den verschiedenen Vogelarten, z.B. im Aufbau des Dorsalhorns [60]. Im Fall von Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) und den meisten anderen Vogelarten sind die Laminae nicht wie bei Säugetieren dorsoventral gestapelt, sondern teilweise seitlich nebeneinander angeordnet (v.a. Laminae II und III) [72, 73]. Als Laminae bezeichnet man Schichten von Neuronen in der grauen Substanz, die aufgrund ihrer zytoarchitektonischen Merkmale klassifiziert wurden [74]. Die Synapse zwischen dem primär afferenten Neuron, in diesem Fall dem Nozizeptor, und den anschließenden neuronalen Strukturen des Rückenmarks erfolgt in den äußeren Strukturen (Laminae I und II) des Dorsalhorns in der grauen Substanz des Rückenmarks [54, 75]. Im Bereich der Laminae I bis III befinden sich vor allem Interneurone, und zumeist nehmen deren Axone einen nozizeptiven Reiz im Dorsalhorn auf und leiten ihn innerhalb des Rückenmarks weiter [75]. Die Interneurone können ein Signal dann an lange Projektionsneurone weitergeben, deren Axone die Mittellinie des Rückenmarks kreuzen, sodass ihre afferenten Fasern sich auf der kontralateralen Seite des Rückenmarks befinden [54, 70, 75]. Diese Projektionsneurone dienen als Verbindungsbahnen zum Gehirn [70]. Ihre afferenten Fasern verlaufen in der weißen Substanz [54]. In selteneren Fällen dienen diese langen Projektionsneurone direkt als Rezipient eines primär afferenten Neurons [75]. In Vögeln konnte auch ein endogenes Opioidsystem nachgewiesen werden, welches der Modulation eines noxischen Reizes dient [60, 76]. Endogene Opiode (z.B.  $\beta$ -Endorphin und Enkephalin) können an Opioidrezeptoren binden, um letztlich Schmerzen zu hemmen [60, 76]. Zusammenfassend erfolgt nach Umschaltung des noxischen Reizes im Dorsalhorn die Projektion der Information auf der kontralateralen Seite in der lateralen Säule des Rückenmarks zu Hirnstamm und Thalamus [54, 60]. Parallel dazu können nozizeptive Reize über Interneurone an Neuronen im Ventralhorn weitergeleitet werden und von dort über efferente Fasern Reflexe auslösen [70, 75]. Insgesamt herrscht die Annahme, dass beim Vogel stärker als beim Säugetier Funktionen direkt auf spinaler Ebene gesteuert werden können ohne in das Gehirn projiziert werden zu müssen [70].

### Verarbeitung im Gehirn und Perzeption

Erst wenn ein noxischer Reiz in entsprechenden Bereichen des Gehirns verarbeitet wird, kann aus diesem Reiz das subjektive Empfinden von Schmerz entstehen [54]. Eine exakte Zuordnung einer einzelnen abgrenzbaren Gehirnregion zur Verarbeitung von noxischen Reizen kann zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht erfolgen [77]. Stattdessen wird häufig der Begriff „pain matrix“ verwendet, um zu beschreiben, dass verschiedene Anteile des Gehirns an der sensorisch-differenzierenden, affektiven und kognitiven Verarbeitung beteiligt sind [54, 77]. Jedoch ist keine der bisher bekannten Regionen ausschließlich spezifisch für die Schmerzwahrnehmung zuständig [77].

Mit Hilfe einer Metaanalyse aus 140 Neuroimaging- Studien konnten 2013 mehrere Regionen des Säugetiergehirns identifiziert werden, welche regelmäßig im Falle einer akuten Schmerzempfindung aktiv sind [78]:

- Primärer somatosensorischer Cortex  
(Neocortex, Cerebrum, Telencephalon)
- Sekundärer somatosensorischer Cortex  
(Neocortex, Cerebrum, Telencephalon)
- Insula  
(Cerebrum, Telencephalon)
- Anteriorer cingulärer Cortex (ACC)  
(Cerebrum, Telencephalon)
- Thalamus  
(Diencephalon)
- Präfrontaler Cortex  
(Cerebrum, Telencephalon)

Eine Zuordnung der Areale des Vogelgehirns, die zur aviären *pain matrix* zählen, ist bisher noch nicht abschließend gelungen [60, 67, 79]. Im Jahr 2005 veröffentlichten Jarvis et al. ihren Vorschlag, veraltete Begrifflichkeiten des Vogelgehirns zu überarbeiten und eine einheitliche Nomenklatur einzuführen [62]. Alle im Folgenden verwendeten Begriffe zur Beschreibung von Gehirnstrukturen bei Vögeln basieren auf dieser überarbeiteten Nomenklatur [62]. Das Gehirn von Vögeln unterscheidet sich in mehreren grundlegenden Aspekten vom Gehirn der Säugetiere [60, 62]. Im Säuger sowie im Vogel kann das Telencephalon, auch als Cerebrum oder Großhirn bezeichnet, in palliale und subpalliale Bereiche unterteilt werden [62, 80, 81].

Die subpallialen Anteile weisen dabei eine ähnliche Organisation auf [82, 83]. Die Organisation des Palliums unterscheidet sich hingegen stark [62, 84]. Sowohl im Säuger als auch im Vogel nimmt das Pallium einen Großteil des Telencephalons ein [62].

Das Säugetier-Pallium umfasst den Paläocortex, Archicortex und Neocortex [62]. Einzigartig und ausschließlich bei Säugetieren zu finden ist der Neocortex mit seinem laminaren Aufbau aus sechs Schichten [62, 85]. Er gilt als ein Teil des Säugetiergehirns, der stark mit der Verarbeitung nozizeptiver Reize und der Wahrnehmung von Schmerzen verknüpft ist [86].

Beim Säugetier erfolgt die Projektion des noxischen Reizes aus dem Thalamus in ebendiesen Neocortex, und es wird angenommen, dass die Verarbeitung im Neocortex ein essenzieller Schritt ist zur bewussten Wahrnehmung des noxischen Reizes als Schmerz [86, 87].

Im Vogel erfolgt die Organisation des Palliums nuklear bzw. in Form von nuklearen Aggregationen, wobei es das Hyperpallium, Mesopallium, Nidopallium und Arcopallium umfasst [62, 83]. Es lässt sich anatomisch kein Neocortex oder eine ihm ähnliche Struktur identifizieren [83, 84]. Es wird jedoch vermutet, dass bestimmte Bereiche des aviären Palliums funktionell mit dem Neocortex von Säugetieren vergleichbar sein könnten [47, 81, 84, 85]. Bekannt ist beispielsweise, dass Reize vom Thalamus an die „dorsal ventricular ridge“ (DVR) weitergeleitet werden, eine nuklear organisierte Struktur des Pallium [62, 85, 88]. Die DVR stellt eine einzigartige Struktur in der Anatomie von Vögeln und Reptilien dar [62]. Sie umfasst Bereiche des Mesopallium, Nidopallium und Arcopallium. [62].

Wissenschaftler konnten in einer Studie von 2018 keine Veränderungen im EEG von erwachsenen Hühnern nach einem noxischen Reiz feststellen [81]. Sie vermuteten jedoch, dass die dem Cortex des Säugetiers funktionell entsprechenden Bereiche im Vogelgehirn weniger oberflächlich liegen [81]. Daher sei es wahrscheinlich, dass entsprechende Veränderungen im elektrischen Signal aufgrund der ungeeigneten Platzierung der Elektroden im Gehirn nicht nachgewiesen werden konnten [81].

Auch wenn ein Vergleich von Hirnstrukturen zwischen Vögeln und Säugetieren nur sehr vorsichtig stattfinden soll, so gibt es doch Grund zur Annahme, dass funktionell ähnliche Strukturen vorhanden sind und damit, dass Vögel Schmerzen als bewusste und negative Erfahrung wahrnehmen können [47, 60, 62, 85].

## 4.3 Schmerzwahrnehmung und Nozizeption bei Neonaten, Feten und Embryonen

### 4.3.1 Schmerzempfindungen durch Neonaten, Feten und Embryonen - artübergreifende Betrachtungen

In der Humanmedizin wurde bis zum Ende des vergangenen Jahrhunderts noch darüber debattiert, ob Neonaten in der Lage sind Schmerzen zu empfinden [89]. Unter anderem aufgrund der Annahme, dass sie neurologisch dazu nicht in der Lage sind, wurden bis in die 1980er Jahre Operationen an Neonaten größtenteils ohne Anästhesie und Analgesie durchgeführt [90]. Inzwischen hat sich das Wissen etabliert, dass Neugeborene in der Lage sind, schmerzhafte Reize zu verarbeiten und Reaktionen unterschiedlicher Art zu zeigen [91]. Forscher konnten 2015 nachweisen, dass sich bei einem schmerzhaften Stimulus die Gehirnregionen, die bei Erwachsenen und Neonaten aktiviert werden, stark ähneln [92]. Die Forscher schlussfolgerten, dass Neonaten Schmerz ähnlich erleben wie Erwachsene, möglicherweise sogar intensiver [92]. Basierend auf dieser Erkenntnis stellt sich dieselbe Frage im Bezug auf die Fähigkeit von Feten, Schmerzen zu empfinden [93]. Die Fähigkeit zu Nozizeption und Schmerzwahrnehmung entwickelt sich progressiv [89, 90, 94, 95]. Beim humanen Fetus wird inzwischen angenommen, dass nicht nur im letzten Trimester die Fähigkeit zum Schmerzempfinden vorhanden sein könnte, sondern bereits früher [89, 90, 94, 95]. Möglicherweise kann bereits im Zeitraum zwischen der 12. und 24. Woche ab Gestation eine Art unreflektiertes Schmerzempfinden nicht mehr ausgeschlossen werden, wobei diese Annahme vornehmlich auf dem Entwicklungsstand der neurophysiologischen Pfade basiert [89, 90, 94, 95]. Die Richtlinien der AVMA (American Veterinary Medicine Association) von 2020 setzen speziesübergreifend für Embryonen von Vögeln 80 % der *in ovo* Entwicklungszeit als Grenzzeitpunkt an, ab welchem ein potenzielles Schmerzbewusstsein angenommen werden sollte [96]. Die AVMA stützt sich hierbei auf Daten aus EEG-Aufzeichnungen [96]. Für Embryonen der Gattung *Gallus Gallus domesticus* mit einer Inkubationszeit von 21 Tage würde dies bedeuten, dass ab Bruttag 16,8 von einem Schmerzempfinden ausgegangen werden kann [96]. Ab diesem Zeitpunkt fordert die AVMA die tierschutzgerechte Euthanasie dieser Embryonen entsprechend den Empfehlungen für Vogelneonaten [96]. Kollmannsperger et al. konnte jedoch 2023 nachweisen, dass Embryonen der Gattung *Gallus Gallus domesticus* bereits ab dem 13. Bruttag ein physiologisches EEG haben [9].

### 4.3.2 Anatomisch - physiologische Voraussetzungen der Schmerz Wahrnehmung und Nozizeption bei Feten und Embryonen - artübergreifende Betrachtungen

Nozizeption und Schmerz sind zwei voneinander zu trennende Phänomene [46]. In vielen Fällen jedoch ist die Schmerz Wahrnehmung mit einer intakten Nozizeption verknüpft und meist bildet Nozizeption die Basis von Schmerz [97, 98]. Für den neurophysiologischen Vorgang der Nozizeption sind bestimmte anatomische Strukturen notwendig [59, 99]. Sind alle diese Strukturen funktionsfähig, können noxische Reize, wie im Kapitel 4.2.2 detailliert beschrieben, bis in übergeordnete Strukturen im Gehirn weitergeleitet werden [100]. Zu diesen essenziellen Strukturen gehören primär Nozizeptoren, Neurotransmitter und Nervenfasern, die bis in das Rückenmark reichen [59, 65, 94]. Von einer funktionierenden Nozizeption kann erst ab Vorhandensein der entsprechend entwickelten Strukturen ausgegangen werden [89]. Basierend hierauf lässt sich für den Hühnerembryo feststellen, dass sich die notwendigen Strukturen kontinuierlich während der Inkubation entwickeln, jedoch vor dem 7. Bruttag keine funktionierende Nozizeption angenommen werden kann [5].

Ohne die Möglichkeit zur verbalen Kommunikation ist ein Empfinden von Schmerz kaum nachweisbar [101]. Stattdessen muss auf indirekte Indizien wie Verhalten und physiologische Parameter (Hormonstatus, Blutdruck, Herzfrequenz) zurückgegriffen werden, um zur Annahme zu gelangen, dass ein Individuum Schmerz empfindet [89, 92, 98, 101]. Trotzdem können, vergleichbar zur Nozizeption, auch anatomische Strukturen herangezogen werden, um Rückschlüsse zu ziehen, ab welcher Entwicklungsstufe ein Organismus frühestens in der Lage sein könnte einen noxischen Reiz so zu verarbeiten, dass dieser als Schmerz wahrgenommen werden kann [98, 102]. Der Entwicklungsstand, ab dem von einem Schmerzempfinden ausgegangen werden kann, ist aber nur schwerlich als Zeitpunkt festzulegen [93, 98]. Die Entwicklung der benötigten Strukturen erfolgt graduell, verschiedene Abschnitte erreichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die benötigte Reife und Funktionsfähigkeit [93, 98].

Darüber, welche Strukturen für ein Schmerzempfinden im Embryo tatsächlich benötigt werden, herrscht unter Wissenschaftlern derzeit Uneinigkeit [89, 90, 93, 95]. Traditionellerweise wurde beim menschlichen Fetus angenommen, dass vor Ausbildung des Cortex und der entsprechenden Strukturen, um einen Reiz vom Thalamus an den Cortex weiterleiten zu können, eine Schmerz Wahrnehmung durch den Fetus ausgeschlossen werden kann [93, 95]. Die Notwendigkeit des Cortex zur Verarbei-

tung eines Reizes und zur Wahrnehmung eines Reizes als Schmerz beim adulten Menschen ist bekannt, jedoch warnt Lowery, dass nicht automatisch von einer Übertragung bekannter Informationen auf einen Fetus ausgegangen werden kann und sollte [98]. Ein Fetus solle nicht als „kleiner Erwachsener“ betrachtet werden [98]. Der früheste Zeitpunkt, an dem ein humaner Fetus dementsprechend Schmerz empfinden könnte, wäre der Moment, indem die Strukturen des Cortex vorhanden sind, funktionsfähig werden und es eine Verbindung zwischen Thalamus und Cortex gibt, sodass ein entsprechender Reiz weitergeleitet und im Cortex verarbeitet werden kann [103]. Vor Ausbildung des Cortex existiert im humanen Fetus jedoch eine Struktur, welche als subcorticale Platte bezeichnet wird [104–107]. Hadders-Algra beschreibt die bisher bekannten Entwicklungsschritte dieser Struktur im Detail in einem Review von 2018 [108]. Die subcorticale Platte ist eine temporäre Struktur im sich entwickelnden Gehirn plazentarer Säugetiere, welche sich zwischen der intermediären Zone und der cortikalen Platte befindet [104–106]. Sie beinhaltet Neuronen und stellt u.a. einen zentralen Punkt für die Differenzierung dieser Neuronen und einen Ausgangspunkt für deren Migration in andere Hirnstrukturen dar [104]. Es ist bekannt, dass Informationen aus dem Thalamus an diese subcorticale Platte weitergeleitet werden, bevor diese sich im Zuge der weiteren Entwicklung des Fetus bzw. Neonaten zurückbildet und die Informationen nun vom Thalamus an den Cortex weitergeleitet werden [93]. Während der Entwicklungszeit des Cortex und der thalamocorticalen Verbindungsstrukturen existiert bereits die subcorticale Platte mit Verbindung zum Thalamus, welche nach Meinung einiger Forscher als eine Art Vorläufer des Cortex dessen spätere Funktion der Schmerzempfindung abdeckt [93, 100]. Entsprechend dieser Theorie könnte ein Embryo bereits früher als bisher angenommen zur Wahrnehmung von Schmerzen befähigt sein [100].

Zusätzlich existiert die Theorie, dass bereits die Strukturen des Mesenzephalons für ein undefiniertes Schmerzempfinden im Embryo ausreichen [95, 100, 109]. Laut dieser Theorie wird für die Wahrnehmung von Schmerz keine spezifische Struktur im ZNS benötigt [95]. Stattdessen könnte jede Struktur, die die entsprechenden Bedingungen der Perzeption erfüllen kann (laut Sekulic 2016 „Organisation, Identifikation und Interpretation sensorischer Informationen zur Darstellung und zum Verständnis der Umwelt“), zur Schmerzwahrnehmung beitragen [95]. Bei Säugetieren tendieren hierarchisch untergeordnete Strukturen dazu, früher auszureifen, in diesem Fall also der Thalamus noch vor den cortikalen Strukturen [95, 98]. Daher könnte das entwickelte Mesencephalon mit dem Thalamus möglicherweise bereits für eine Art Schmerzempfinden ausreichen [100]. Es ist jedoch zu bedenken, dass



in sehr jungen Embryonen keine Modulationsfunktionen vorhanden sind, und die Schmerzwahrnehmung, falls vorhanden, diffus ausfallen könnte, oder aber auch in Form einer Art Hypersensitivität intensiver sein könnte [95, 100]. Ist bereits beim Säugetier nicht abschließend geklärt, welche Strukturen im Gehirn letztlich für ein Schmerzempfinden notwendig sind und ab wann sie funktionsfähig werden so ist über die Situation im aviären Embryo noch weniger bekannt [5]. Die Unterschiede zwischen aviären und humanen Gehirnstrukturen machen eine Übertragung der wissenschaftlichen Erkenntnisse vom Menschen auf den Vogel schwierig [60, 62]. Trotzdem konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass das Gehirn eines Hühnerembryos ab dem 13. Bruttag ein physiologisches EEG aufweist und damit potenziell ein nozizeptiver Reiz verarbeitet und als Schmerz wahrgenommen werden könnte, auch wenn nicht geklärt ist, ob die dafür benötigten cerebralen Strukturen zu diesem Zeitpunkt bereits ausgebildet sind [9]. Zum jetzigen Zeitpunkt wird ein Schmerzempfinden vor diesem Bruttag ausgeschlossen [9].

## 5. Verhalten und Schmerz

Bracke und Hopster beschreiben das natürliche Verhalten als das Verhalten, welches von einem Tier gezeigt wird, unter Bedingungen, die seinem natürlichen Lebensraum ähneln [110]. Verhaltensweisen, die das Tier in unangenehmen oder bedrohlichen Situationen zeigt, sind nicht Teil des natürlichen Verhaltens [110]. Die Vielfalt der Vogelarten erschwert es, verallgemeinernde Aussagen über ihr natürliches Verhalten zu treffen [52].

Als Vorfahren unserer heutigen Haushühner gilt größtenteils das Bankivahuhn (*Gallus gallus*, Red Junglefowl) [111, 112]. Ursprünglich beheimatet im südostasiatischen Raum, wurden Bankivahühner seit der neolithischen Evolution hinweg domestiziert und ihre Nachfahren schließlich weltweit verbreitet [111, 113, 114]. Die Domestizierung, ebenso wie weitere Faktoren z.B. Umweltbedingungen und Zucht, haben Einfluss auf das Verhalten einer Spezies [112, 115]. Viele Verhaltensweisen des Bankivahuhns sind bei den heutigen Haushühnern weiterhin erkennbar, jedoch zeigen Studien in manchen Bereichen auch klare Unterschiede [112, 116].

### 5.1 Verhalten adulter Vogel:

#### Haushuhn, *Gallus Gallus domesticus*

##### 5.1.1 Normverhalten

Arttypisch für Vögel sind Hühner primär reflexgeleitete Tiere, welche stark durch ihre visuelle Wahrnehmung beeinflusst werden [117, 118]. Sie gelten als Beutetiere mit hohem Schutzbedürfnis und zeigen nur sehr subtile Anzeichen für Unwohlsein oder Schmerz [117, 118]. Eine gute Kenntnis des Normverhaltens dieser Spezies ist daher Voraussetzung für eine mögliche Beurteilung des schmerzassoziierten Verhaltens [52, 68, 118].

Zum Normverhalten zählen u.a. die speziestypischen Verhaltensweisen bezüglich Nahrungs- sowie Wasseraufnahme und das Ausüben von Pflege- und Komfortverhalten [112, 117]. Veränderungen im Normverhalten (z.B. verminderte Gefieder-

pflege) können ebenso Hinweise auf Unwohlsein oder Schmerz sein wie spezifische Verhaltensweisen, welche als schmerzassoziiert gelten (z.B. verkleinerte Lidspalte) [52, 118]. Für ein vollständiges Ethogramm des Normverhaltens von Haushühnern wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

### 5.1.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

Angesichts der Vielfalt von über 10 000 verschiedenen Vogelarten ist es ebenso wie beim Normverhalten auch bezüglich des schmerzassoziierten Verhaltens von Vögeln kaum möglich, allgemeingültige Aussagen zu treffen [52, 119]. Aussagen bezüglich spezifischer Verhaltensweisen, die auf einen Schmerzzustand hindeuten, müssen daher bestenfalls speziesspezifisch sein [118, 119].

Während bei Säugetieren bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt wurden und für mehrere Spezies mittlerweile evaluierte Methoden zur Schmerzerkennung existieren, befindet sich diese Entwicklung für Vögel allgemein noch in den Anfängen [52, 119]. Generell zeigen Vögel jedoch nur sehr subtile Anzeichen von Schmerz [118]. Das Erkennen von Schmerzen bei Vögeln anhand von Verhaltensweisen oder -änderungen ist zudem eine komplexe Aufgabe, da sich diese subtilen Anzeichen deutlich von schmerzassoziierten Verhaltensweisen bei Säugetieren unterscheiden können [52, 118]. Ein Beispiel hierfür ist das geringer ausgeprägte Vermögen von Vögeln, Unwohlsein mittels Mimik auszudrücken, was die Etablierung von Schmerzskalen im Stil einer „Grimace scale“, wie beispielsweise für Mäuse, erschwert [49, 52, 120].

Eine wichtige Grundlage ist, dass das Normalverhalten einer Spezies bekannt ist und vom Beobachter sicher erkannt wird [52, 68, 118]. Erst dann ist es möglich, Abweichungen hiervon zu erkennen und als möglicherweise schmerzassoziiert zu identifizieren [68]. Dabei stellt auch die Abwesenheit von normalerweise typischen Verhaltensweisen eine Abweichung dar, der Bedeutung beigemessen werden muss [52].

Wie bei Säugetieren gibt es auch bei Vögeln zusätzliche erschwerende Faktoren, die eine präzise Beschreibung schmerzassoziierten Verhaltens beeinträchtigen [52]. Neben speziesspezifischen Unterschieden und Einflussfaktoren wie z.B. Alter und Geschlecht zeigen auch Vögel individuelle Unterschiede in ihrer Reaktion auf Schmerz, die unter anderem von vorherigen Schmerzerlebnissen beeinflusst werden [68]. Des Weiteren ist die Art des Schmerzes zu berücksichtigen, da akuter Schmerz andere Reaktionen hervorrufen kann als chronischer Schmerz, wobei die Übergänge fließend sein können [52, 118]. Beispiele beobachteter Reaktionen sowie klinischer Symptome sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Bei der Interpretation von Verhaltenswei-

sen ist es zu bedenken, dass ein übergeordneter Fluchtreflex eventuell vorhandene Symptome kaschieren könnte [118].

Tabelle 5.1: Übersicht häufig beobachteter schmerzassoziierter Reaktionen und klinischer Symptome von Vögeln. Unterscheidung nach akutem oder chronischem Schmerzerlebnis [50, 52, 60, 69, 118, 121, 122].

Akuter Schmerz	Chronischer Schmerz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auge z.B. Lidspalte verkleinert</li> <li>• Unruhe</li> <li>• Lahmheit</li> <li>• Veränderung bzgl. Futteraufnahme</li> <li>• Veränderung bzgl. Aktivität</li> <li>• Körperhaltung</li> <li>• Vokalisation</li> <li>• übermäßige Pflege bis zur Selbstverletzung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schutzverhalten bzgl. der schmerzhaften Region</li> <li>• Vermeidungsverhalten</li> <li>• Selbssolation</li> <li>• Selbstverletzung,</li> <li>• Nahrungsverweigerung</li> <li>• Aggression</li> <li>• Lethargie</li> <li>• Starre</li> </ul>

Zusätzlich spielt die Intensität des Schmerzreizes eine Rolle, wobei zu beachten ist, dass ein stärkerer Reiz nicht unbedingt mit einer stärkeren Reaktion verbunden ist [52, 118]. Viele Vögel reagieren bei höherer Intensität des Schmerzes verstärkt mit Passivität [52, 118]. Außerdem muss Stress als Einflussfaktor berücksichtigt werden, da dieser unabhängig von Schmerz das Normverhalten eines Individuums beeinflussen kann und von schmerzassoziertem Verhalten zu unterscheiden ist [123].

Zuletzt ist zu beachten, dass auch Nozizeption, ohne Schmerzwahrnehmung, Reaktionen im Verhalten (ebenso wie auch physiologische Veränderungen) auslösen kann [124]. Diese nozifensiven Reaktionen müssen teilweise nicht in höher entwickelten Bereichen des Gehirns verarbeitet werden, sondern können gegebenenfalls bereits auf der Ebene des Hirnstammes verarbeitet werden [59, 124]. Die Interpretation eines Verhaltens als schmerzassoziert erfordert demnach eine gründliche Prüfung [59].

Eine klinische Untersuchung stellt für viele Vögel eine erhebliche Stresssituation

dar, was zu Veränderungen im Verhalten führen kann [123, 125]. Besonders Vogelarten, die als Beutetiere gelten, verbergen ihre Schmerzreaktionen dabei in der Regel sehr effektiv [118]. Allein die Anwesenheit eines Beobachters kann potenziell bereits Veränderungen im Verhalten hervorrufen [52, 68]. Eine Beurteilung sollte daher zuerst möglichst ohne jegliche Einwirkungen von außen stattfinden [52, 126]. Zudem ist eine reizarme Umgebung Voraussetzung für eine valide Beobachtung des Verhaltens von Vögeln [118]. Trotzdem wird die Evaluierung des Verhaltens auch bei Vögeln von manchen Autoren als ein relevanter Teil der Schmerzevaluierung betrachtet [52, 119].

Mikoni et al. haben in einem 2022 veröffentlichten Review die bekannte englischsprachige Literatur zu schmerzassoziierten Verhaltensweisen bei Vögeln ausgewertet [119]. Knapp die Hälfte der 132 ausgewerteten Veröffentlichungen bezog sich hierbei auf Hühnervögel (*Gallus Gallus*) [119]. Unter Berücksichtigung welche Art von Schmerzreiz in vielen der Veröffentlichungen genannt wird, ist auffällig, dass es oft Reize sind, welche mittelbar mit Zucht oder Haltungsbedingungen durch den Menschen verknüpft sind (z.B. Schnabelkürzen, Arthritis) [119]. Eine adaptierte Übersicht der Ergebnisse dieser Literaturrecherche, spezifisch für Hühner, ist in Tabelle 5.2 dargestellt [119].

Hühner sind Beutetiere und leben innerhalb ihrer Herde in einer Hierarchie [112]. Beide Faktoren führen dazu, dass sie keine offensichtlichen Anzeichen von Schmerz zeigen [118]. Anzeichen von Schwäche würden die Aufmerksamkeit von Raubtieren wecken und auch den eigenen Stand innerhalb der Rangfolge gefährden [118]. Trotzdem zählen Hühner zu den am besten erforschten Vögeln bezüglich ihres schmerzassoziierten Verhaltens, auch aufgrund der Relevanz von Hühnervögeln in der weltweiten Geflügelwirtschaft [113, 119]. Während eine Übersicht über beobachtete Verhaltensweisen oder -änderungen in Reaktion auf verschiedene noxische Reize bereits in Tabelle 5.2 dargestellt ist, sollen einige Ergebnisse hier zusätzlich hervorgehoben werden.

Das Schnabelkürzen stellte über lange Zeit auch in Deutschland einen regulären Eingriff v.a. bei Legehennen dar, vor dem Hintergrund, das Verletzungsrisiko durch gegenseitiges Bepicken der Hühner zu senken [119, 127]. Seit 2017 werden in Deutschland in der Regel keine Hennen mit kupierten Schnäbeln mehr eingestellt, denn eine Schnabelkürzung ist nach §6 des deutschen Tierschutzgesetzes als Form der Amputation ohne Indikation unzulässig [1, 127]. Nur bei anerkannter Notwendigkeit und Genehmigung dürfen die Schnäbel von Hühnervögeln gekürzt werden [127]. Aus dieser ehemals üblichen Praxis ergibt sich jedoch, dass ein großer Teil der Studien, welche sich mit dem Schmerzempfinden und Schmerzverhalten

von Hühnern beschäftigten, den Eingriff des Schnabelkürzens als noxischen Reiz nutzten [119]. Die Ergebnisse der Studien, trotz unterschiedlicher Techniken der Eingriffe, ähneln sich dabei [119]. Auffällig war hier vor allem ein vermindertes Normalverhalten (bzgl. Nahrungs- und Wasseraufnahme) sowie Erkundungs- und Komfortverhalten [119]. Insbesondere Aktivitäten, welche im Zusammenhang mit dem Schnabel, hier der potenziell schmerzhaften Region, stehen, waren vermindert z.B. Kopfschütteln und Schnabelwetzen [119]. Häufig zeigten die Tiere längere Ruhezeiten [119].

Tabelle 5.2: Übersicht über beobachtete Reaktionen und Verhaltensweisen von Hühnervögeln (*Gallus Gallus domesticus*) nach potenziell noxischen mechanischen Reizen. Tabelle modifiziert nach Mikoni et al. [119].

Noxischer Reiz	Reaktionen, Verhalten	Quelle
Mechanischer Reiz durch Federzupfen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vokalisation</li> <li>• Flügelschlagen</li> <li>• Springen</li> <li>• Bewegungslosigkeit</li> <li>• Kopf und Schwanzfedern gesenkt</li> </ul>	[128, 129]
Mechanischer Reiz an Kamm und Kehllappen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrtes Ruhen</li> <li>• Verringerte Futteraufnahme</li> <li>• Verringerte Stehzeiten</li> </ul>	[130]
Mechanischer Reiz an Flügel und Brust	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vokalisation</li> <li>• Bepicken der Federn</li> <li>• Aufregung</li> </ul>	[131]

Fortsetzung der Tabelle 5.2

Noxischer Reiz	Reaktionen, Verhalten	Quelle
Mechanischer Reiz am Schnabel (Schnabelkürzen)	<p>Vermehrt beobachtete Verhaltensweisen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruhen (stehend, liegend)</li> <li>• Reaktionszeit zur Erkundung neuer Gegenstände in der Umgebung</li> </ul> <p>Verringert beobachtete Verhaltensweisen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Futter- und Wasseraufnahme</li> <li>• Aktivität (gehen, laufen, Erkundungsverhalten)</li> <li>• Staubbaden</li> <li>• Bodenscharren</li> <li>• Putzverhalten</li> <li>• Pickverhalten (Umwelt, neue Objekte)</li> <li>• Pickfrequenz, -geschwindigkeit, -kraft</li> <li>• Erkundungsverhalten mit Schnabel</li> <li>• Kopfschütteln</li> <li>• Schnabelwetzen/-wischen</li> <li>• Gewichtszunahme</li> <li>• Eiproduktion</li> </ul>	[132–153]
Mechanothermischer Reiz an Bein oder Brustbein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plötzliches Aufstehen</li> <li>• Schlurfen</li> <li>• Bepicken der Reizursache</li> <li>• Zucken</li> </ul>	[154]

Fortsetzung der Tabelle 5.2

Noxischer Reiz	Reaktionen, Verhalten	Quelle
Mechanischer Reiz durch buccale Injektion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bewegungslosigkeit</li> <li>• Ducken</li> <li>• Kopfeinziehen</li> <li>• verringerte Kopfbewegungen</li> <li>• gesträubtes Gefieder</li> <li>• Augen (z.B. Pupillengröße, Lider geschlossen)</li> </ul>	[155]

## 5.2 Verhalten Embryo: Haushuhn *Gallus Gallus domesticus*

### 5.2.1 Normverhalten (*in ovo*)

Bewegungen oder gar Verhaltensweisen von Hühnerembryonen im Ei werden schon lange untersucht [156]. Einer der ersten, der diese Beobachtungen verschriftlichte und veröffentlichte, war Preyer im Jahr 1885 [156, 157]. Seitdem wurde vor allem in den 1960er Jahren durch und unter Beteiligung von Viktor Hamburger viel zum Verhalten und zu Bewegungen von Hühnerembryonen *in ovo* geforscht und veröffentlicht [14, 158–161]. Erste Bewegungen konnten dabei ab Bruttag 3 (ED, embryonic day) beobachtet werden [158]. Eine schrittweise Abfolge der zunehmenden Motilität eines Hühnerembryos entsprechend der Bebrütungstage und dementsprechend des Entwicklungsstadiums ist in Tabelle 5.3 dargestellt.

Preyer, der sich in einer Veröffentlichung intensiv mit den Bewegungen von Hühnerembryonen auseinandergesetzt hat, ging davon aus, dass diese frühen Bewegungen nicht durch sensorische Einflüsse provoziert werden, sondern autonom sind [157, 158]. Auch Hamburger bezeichnet diese beobachteten Bewegungen als spontan und nicht reflexartig [158]. Die Reflexbögen für exterozeptive Sensitivität schließen sich erst ab in etwa ED6,5 [162, 163]. Diese ersten embryonalen Bewegungen setzen vor Schluss der Reflexbögen an ED3,5 ein und erst nach deren Schluss können Bewegungen durch externe Einflüsse provoziert werden [158]. Auch



Tabelle 5.3: Auftreten von Bewegungen von Hühnerembryonen *in ovo* ab Beginn der Inkubation bis ED8 nach Hamburger und Balaban (1963) [158].

Tage der Inkubation	Beobachtete Bewegungen
ED3,5	Start spontaner, zyklischer Bewegungen
ED3,5 - 4	Flexion im Bereich der Halswirbelsäule
ED4	Start wellenartiger Bewegung (S-Wellen, cephalocaudale Richtung) im Bereich des Körpers
ED5	Wellenartige Körperbewegung mit höherer Frequenz, teilweise ganzer Körper beteiligt, erste Abweichungen vom cephalocaudalen S-Wellen Schema
ED6,5	Zusätzlich erste Bewegungen an Flügel und Beinen, oft integriert in die Körperwellenbewegung, selten auch isolierte Bewegung der Gliedmaßen
ED6,5 - 7	Oberflächliche Berührungen rufen keine Reaktion hervor, gezielte Manipulation (Bewegen) des Kopfes provoziert regelmäßig eine S-Welle
ED7 - 7,5	Teilweise erste exterozeptive Reflexe (Flexion im Nacken, S-Welle) auslösbar bei Provokation im trigeminalen Bereich (Oberschnabel)
ED8	Bewegungen durch Berührung von Gliedmaßen und Kopf mit erhöhter Regelmäßigkeit provozierbar

Lee et al. bestätigten, dass nach etwa 6,5 Tagen der Inkubation erstmals afferente Fasern eine Verbindung ins Rückenmark herstellen [164]. Wissenschaftler schlussfolgerten aus diesen Erkenntnissen, dass die vorher beobachteten Bewegungen nicht reflexgesteuert sein können [156–159].

Embryonale Bewegungen sind rhythmisch alternierend zwischen Aktivitäts- und Inaktivitätsphasen, bis ED17 [158, 159]. Inaktivitätsphasen wurden hierbei von den Autoren der Studie definiert als Zeiträume ohne Bewegung ab einer Länge von mindestens 10 Sekunden [159]. Je eine Aktivitäts- und Inaktivitätsphase bilden einen Zyklus [158]. Die Autoren bezeichnen außerdem den prozentualen Anteil der Zeit im Beobachtungszeitraum, der in Bewegung verbracht wurde, als „overall activity“ [159].

Die Phasen der „overall activity“ nehmen hierbei in etwa 20 % eines Gesamtzyklus ein [158]. Ab in etwa ED8,5 werden die Aktivitätsphasen bis ED13 zunehmend länger [159]. Ein Aktivitätsmaximum von in etwa 80 % wird laut den Autoren an ED13 erreicht und das Aktivitätslevel bleibt dann in etwa gleich bis ED17 [159]. Danach fällt die Aktivität wieder ab, vor allem durch eine verringerte Aktivitätszeit bei gleichbleibender Inaktivitätszeit [159]. In einer Studie von 2001 wurden die Bewegungen von Hühnerembryonen erneut untersucht [165]. Die Klassifizierung der Bewegungen erfolgte nach anderen Kriterien [165]. Trotzdem konnten die grundlegenden Meilensteine entsprechend Tabelle 5.3 verifiziert werden [165]. Geringe

Abweichungen wurden von den Autoren u.a. mit stochastischen Varianzen oder geringgradig unterschiedlichen Inkubationsmethoden begründet [165]. Nach Wu et al. entwickeln sich vier verschiedene Bewegungsmuster entsprechend folgender Chronologie [165]:

An ED3 starten embryonale Rumpfbewegungen [165]. An ED7 beginnen allgemeine Körperbewegungen gefolgt von einseitigen Bewegungen der Gliedmaßen an ED8 [165]. Ab ED9 können auch bilaterale parallele Gliedmaßenbewegungen auftreten [165]. Ebenfalls bestätigt werden konnte der kontinuierliche Anstieg der Aktivität mit den Entwicklungstagen [165]. Aktivitätsmaxima konnten in dieser Studie an ED12 und ED16 beobachtet werden [165]. Ebenfalls bestätigt werden konnte die Abnahme der Aktivität nach ED16 kontinuierlich bis zum Schlupf [165]. In einer Studie wurde an ED11 getestet, ob externe Stimulation, welche ab ED8 eine Bewegung provozieren kann, die Rhythmik aus Aktivität und Inaktivität beeinflusst [166]. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden [166]. Die Berührung während einer Inaktivitätsphase provozierte eine Bewegung, veränderte aber nicht das Muster der Aktivitäts- und Inaktivitätsphasen [166]. Die zyklische „overall activity“ ist folglich unabhängig von exterozeptiven wie auch von propriozeptiven Stimuli [161, 166].

In weiteren Studien wurde die spinale Verbindung zum Gehirn unterbrochen und erneut die Bewegungen und Aktivität der Embryonen untersucht [158, 159]. Untersuchungen wurden an Embryonen bis zu ED17 durchgeführt [159]. Der operative Eingriff zur Unterbrechung der Verbindung zum Gehirn wurde dabei im frühen Entwicklungsstadium von ED2 vorgenommen [158, 159]. Zusammengefasst änderte sich durch diesen Eingriff die Qualität der Bewegungen nicht, aber insgesamt wurde 10-25 % weniger Aktivität („overall activity“) beobachtet [158, 159].

Die Autoren schlossen hieraus, dass das Gehirn in diesem Entwicklungszeitraum nicht essenziell ist, um diese Art der Bewegungsmuster hervorzurufen, sondern einen rein quantitativen Einfluss hat [159].

Weitere Versuche dienten der Überprüfung möglicher Einflüsse durch externe sensorische Reize auf das Bewegungsprofil [161]. Mittels einer operativen Unterbrechung afferenter Fasern, ebenfalls an ED2, in sich entwickelnden Rückenmark wurde dies spezifisch für die Bewegung eines Beines getestet [161]. Das beobachtete Bein wies nach dem operativen Eingriff keinerlei Sensitivität gegenüber exterozeptiven Reizen mehr auf [161]. Häufigkeit und Art der Bewegungen von Embryonen bis ED17 wurden beobachtet [161]. Bis ED15 konnte kein Einfluss auf die Quantität und Qualität von Bewegungen des Beines durch das Fehlen sensorischer Reize nachgewiesen werden [161]. Die Autoren der Studien schlagen vor, dass die Bewegungen

zumindest bis in etwa ED15 / ED17 durch autonome Impulse im Rückenmark, z.B. spinaler Motoneurone, entstehen [159, 161].

Auffällig ist, dass das Absinken der Aktivität mit dem Einsetzen von Bewegungen korreliert, welche in einer weiteren Studie als „koordinierte Bewegungen“ bezeichnet wurden und schließlich zum Einnehmen der für den Schlupf benötigten Position führt [159, 160]. Laut Hamburger beginnen diese koordinierten Bewegungen erst an ED17 [160]. Eine koordinierte Bewegung ist hierbei definiert als „gerichtet“ [160]. Wichtige Komponenten dieses neuen Bewegungsmusters beinhalten rotierende Elemente sowie Schulterbewegungen [160]. Es kann angenommen werden, dass diese gerichteten Bewegungen von höheren neuronalen Zentren gesteuert werden, die in diesem Zeitraum aktiv werden [160]. In weiteren Studien wurden die Bewegungen von Hühnerembryonen nicht durch direkte Beobachtung, sondern mittels Elektromyographie (EMG) beurteilt [167]. Hierbei wurde festgestellt, dass auch für Bewegungen, die in direkter Beobachtung als unkoordiniert wahrgenommen werden, die im EMG gemessenen Aktivierungsmuster eine gewisse Regelmäßigkeit aufweisen [167].

In einer Veröffentlichung von 1967 werden im Detail Bewegungsvorgänge ab ED17 beschrieben, welche notwendig sind, damit der Embryo die sogenannte Schlupfposition einnimmt [160]. Diese ist Voraussetzung für einen erfolgreichen Schlupf [160]. Laut Hamburger und Oppenheim ist nicht klar, ob sich die koordinierten Bewegungen aus den unkoordinierten, spontanen Bewegungen heraus entwickeln [160]. Jedoch können die beschriebenen unkoordinierten Bewegungen auch nach ED17 noch beobachtet werden [160]. Sie werden jedoch unterbrochen, wenn eine gerichtete Bewegung stattfindet [160].

Ausnahme war die von den Autoren als „Beak clapping“ bezeichnete Schnabelbewegung, welche konstant zu jeder Zeit beobachtet werden konnte [160]. „Beak clapping“ wurde hier als ein schnelles Öffnen und Schließen des Schnabels in rascher Folge beschrieben [160]. Die Beschreibung stimmt mit der als „Mandibulation“ bezeichneten Bewegung in späteren Veröffentlichungen bei adulten Hühnern wie auch Hühnerembryonen überein [7, 168].

### 5.2.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

Wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben wurden die Bewegungen und Verhaltensweisen von Hühnerembryonen intensiv untersucht. Dabei wurde der Fokus vor allem auf die natürlich auftretenden Bewegungen gelegt und auf die möglichen physiologischen und anatomischen Hintergründe der Entstehung dieser Bewegungen.

Eine der wenigen Publikationen, welche laut eigener Aussage u.a. schmerzspezi-

fische Reize am Hühnerembryo untersuchte, stammt von Chumak aus dem Jahr 1961 [169]. In dieser Studie wurden Embryonen im Alter von ED3 bis ED20 untersucht [169]. Es wurden neben potenziell schmerzhaften, noxischen Reizen (mechanisch, Nadelstiche) auch nicht noxische Reize am Embryo gesetzt und die Reaktionen makroskopisch beobachtet [169].

Bei Reizapplikation im Bereich des Schnabels wurden ab ED7 erste reflektorische Reaktionen der Embryonen sowohl auf die schmerzspezifischen als auch die anderen Reize beobachtet [169]. Zumeist handelte es sich um Flexionen im Kopfbereich [169]. Der Autor war nach eigener Angabe in der Lage, diese reflektorischen Bewegungen eindeutig von den spontanen Bewegungen der Embryonen in diesem Entwicklungsstadium zu unterscheiden [169].

Im weiteren Verlauf der Entwicklung konnten entsprechende Reaktionen auch bei Reizapplikation in zunehmend kraniokaudaler Richtung provoziert werden [169]. Ab ED11 wurden generalisierte tonische Bewegungen in allen Bereichen des Körpers nach schmerzspezifischer, aber auch mechanischer und thermischer Stimulation der Haut beobachtet [169]. Der Autor beschreibt, dass ab ED14 bis ED15 die reflektorischen Reaktionen zunehmend spezifischer erschienen [169]. Bewegungen wie Schütteln oder Kratzen wurden beobachtet und als Abwehrreaktionen interpretiert [169].

Auch chemische Stimuli wurden getestet [169]. Dabei konnte bei Applikation einer Schwefelsäurechininlösung oder schwacher Salzsäure in die Schnabelhöhle ab ED9/ED10 eine nicht näher beschriebene Bewegungsreaktion des Embryos beobachtet werden [169]. Vom Autor wurde dies als Abwehrreaktion gewertet [169]. Chumak betrachtete seine Beobachtungen als Nachweis, dass Nozizeptoren, aber auch thermische und mechanische Rezeptoren der Haut, ab ED7 reflektorische Bewegungsreaktionen hervorrufen können [169].

# 6. Methoden der Verhaltensforschung

## 6.1 Die Definition von „Verhalten“

Levitis et al. beschreiben Definitionen als beliebig und dynamisch, beeinflusst vom aktuellen Stand des Wissens [170]. Besonders für Begriffe wie „Verhalten“ trifft dies zu, denn es existiert keine allgemeingültige oder weitreichend anerkannte Definition dafür, was „Verhalten“ ist [170, 171]. In ihrer Studie wiesen Levitis et al. nach, dass es nicht nur keinen Konsens zwischen Wissenschaftlern gibt, was als Verhalten zu werten ist, sondern die Meinungen in weiten Teilen sogar widersprüchlich sind [170]. Basierend auf dieser Studie entwickelten die Autoren jedoch einen Vorschlag für eine Definition von Verhalten, welcher an dieser Stelle wiedergegeben werden soll: „Behaviour is: the internally coordinated responses (actions or inactions) of whole living organisms (individuals or groups) to internal and/or external stimuli, excluding responses more easily understood as developmental changes“ [170].

## 6.2 Die Entwicklung der Verhaltensforschung

Die Beobachtung und Untersuchung des Verhaltens verschiedener Spezies beschäftigt die Menschheit schon seit sehr langer Zeit, einige der ältesten Aufzeichnungen stammen von dem bekannten Philosophen und Naturforscher Aristoteles [171]. Diese Aufzeichnungen sowie andere aus den folgenden Jahrhunderten bestehen hierbei vor allem aus Beschreibungen und Beobachtungen von Tieren und ihren Aktivitäten ohne einen systematischen wissenschaftlichen Ansatz zu verfolgen, so wie er inzwischen erwartet wird [171, 172]. Eine systematische wissenschaftliche Verhaltensforschung hat sich laut dem Soziobiologen Peter Kappeler erst in den letzten etwa 150 Jahren entwickelt, beginnend mit Charles Darwin, welcher aus seinen Beobachtungen von aviärem Verhalten Rückschlüsse auf deren Nutzung zog [171, 173]. In dieser Zeit haben sich nicht nur Konzepte zur systematischen

Erforschung von Verhaltensweisen entwickelt, sondern auch der technische Fortschritt sorgte für einen Wandel [171]. Neben der klassischen akuten Beobachtung und Anfertigung von Notizen gibt es inzwischen seit vielen Jahren Sensoren, Ton- und Filmaufnahmen und verschiedenste Arten von Messgeräten, um Forscher bei ihrem Vorhaben zu unterstützen [171]. Zu den neuesten technischen Hilfsmitteln zählt aktuell die Nutzung von künstlicher Intelligenz („artificial intelligence“, AI) und dabei besonders der Bereich „machine learning“ [174]. Trotzdem ist aktuell für eine abschließende Bewertung und Interpretation der gesammelten Daten die menschliche Einschätzung weiterhin unabdingbar [174].

### 6.3 Verhaltensbeobachtung durch den Menschen

In der Verhaltensforschung bleibt der Mensch meist der primäre Beobachter, der Bewegungen beobachtet, notiert und interpretiert [175]. Laut aktueller Literatur ist ein sorgfältig ausgearbeitetes Datenblatt weiterhin eine effektive Methode zur Datenerfassung [175]. Ein wesentliches Kriterium dabei ist, dass das Auswertungssystem vor Beginn der Datenerhebung vollständig ausgearbeitet sein muss [176]. Beispielsweise sollten die Kategorien, in die bestimmte Bewegungen vom Beobachter eingeordnet werden, unmissverständlich definiert sein [176]. Andernfalls besteht das Risiko, dass die Definitionen im Verlauf der Datenerfassung zunehmend angepasst und somit verändert werden, ein Phänomen, das als „observer drift“ bezeichnet wird [176].

In diesem Zusammenhang ist auch die sogenannte „reliability“ von Daten ein zu beachtender Punkt [176]. Diese „reliability“ beschreibt die Zuverlässigkeit oder auch Reproduzierbarkeit der Daten [176]. Bei einer hohen Zuverlässigkeit/Reproduzierbarkeit sollte bei wiederholten Messungen das selbe Ergebnis erzielt werden [176]. Ein menschlicher Beobachter stellt hierbei jedoch immer eine zusätzliche Variable dar [176, 177]. Menschen sind in ihrer Einschätzung grundsätzlich nicht vollständig objektiv [177]. Auch beim Einsatz mehrerer Beobachter ist mit Unterschieden in der Bewertung zwischen den Beobachtern zu rechnen [176]. Kaufman et al. bemängeln daher, dass in einer stichprobenhaften Untersuchung von 2009 im Bereich der tierischen Verhaltensforschung nur ein sehr geringer Prozentsatz veröffentlichter Studien Details zur genauen Methodik der Beobachtung enthielt [178]. Vor allem im Bereich der Verhaltensforschung sind die Beobachter oft im Besitz relevanter Informationen bezüglich der zu beobachtenden Studienobjekte [177, 179]. Dies birgt das Risiko, dass die gewünschten oder erwarteten Ergebnisse im Auswertungsprozess favorisiert werden [180, 181]. Diese Voreinge-

nommenheit wird oft als „observer bias“ beschrieben [177]. Eine Verblindung stellt eine gute Möglichkeit dar, die Einflüsse einer „observer bias“ möglichst gering zu halten [177, 181]. Verblindung bedeutet hierbei, dass der Untersucher bis nach der Datenerhebung keine Kenntnis darüber hat, ob und/oder wie die zu beobachtenden Tiere z.B. behandelt oder gehalten wurden [181]. Bereits 2004 wurde jedoch in einer stichprobenhaften Untersuchung deutlich, dass nur sehr wenige Studien aus dem Bereich der Verhaltensforschung bei Tieren, darauf hinwiesen, dass die Auswertung zumindest teilweise verblindet durchgeführt wurde [182].

Ein allgemeiner Konsens besagt, dass durch Erfahrung und Training Beobachter zunehmend in der Lage sind, objektiver zu urteilen [176]. Trotzdem sollten Schwankungen in der Bewertung durch einen Beobachter oder durch verschiedene Beobachter sowie die Auswirkungen auf die Ergebnisse stets in Betracht gezogen werden [178]. Auch der mögliche Einfluss des Geschlechts der Beobachter und dessen Auswirkungen wurden in der Literatur diskutiert [183]. Eine Studie aus dem Jahr 2003 deutet jedoch darauf hin, dass dieser Einfluss gering ist [183]. Ein weiteres Phänomen, das im Zusammenhang mit Auswertungen durch Menschen bekannt ist, ist die „observer fatigue“ [176]. Lange Zeiträume der Beobachtung können zu Erschöpfung beim Beobachter führen, was wiederum Auswirkungen auf dessen Bewertung haben könnte [176].

Man unterscheidet außerdem zwischen der „Inter-observer-reliability“ (IeOR) und der „Intra-observer-reliability“ (IaOR) [176]:

- Die IaOR beschreibt die Reproduzierbarkeit von Messungen, die ein Beobachter an denselben Tieren mehrfach durchführt [176]. Es geht darum, wie konstant ein Beobachter dieselben Ergebnisse bei einer Beobachtung derselben Tiere erzielt [176].
- Die IeOR beschreibt, wie konsistent zwei oder mehr Beobachter die gleichen Tiere bewerten [176]. Es geht darum, ob verschiedene Beobachter dieselben Ergebnisse bei einer Beobachtung derselben Tiere erzielen [176].

In vielen wissenschaftlichen Publikationen finden sich keine Daten zur IeOR bei der Beobachtung von Verhaltensweisen durch einen Menschen [178]. Eine zunehmend häufiger werdende Empfehlung besteht darin, dass bei Verhaltensbeobachtungen Statistiken zur IaOR und IeOR durchgeführt und berichtet werden sollten [178, 179]. Die häufig genutzte Angabe von prozentualer Übereinstimmung wird von manchen Autoren als unzureichend betrachtet [178]. Passendere Optionen zur statistischen Berechnung sind in der Literatur beschrieben [178]. Häufig genutzt ist hierbei „Cohen's Kappa“, eine Variante, bei der die Auswertungen zwei-

er Beobachter verglichen werden können und die Möglichkeit, dass sie per Zufall übereinstimmen, mit einberechnet wird [178, 184]. Aus dem bereinigten Wert für Kappa wurde der Anteil der Übereinstimmung herausgerechnet, der durch Zufall hätte entstehen können [178]. Die mathematische Formel lautet [178]:

$$\kappa = \frac{O - E}{N - E}$$

O stellt die Anzahl der Übereinstimmungen beider Beobachter dar, E die Anzahl der erwarteten Übereinstimmungen durch Zufall und N die Gesamtzahl der Beobachtungen [178]. Kappa kann hierbei Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ein Wert von 1 bedeutet vollständige Übereinstimmung, 0 entspricht der durch Zufall zu erwartenden Übereinstimmung, und negative Werte bedeuten eine geringere Übereinstimmung als durch den Zufall zu erwarten wäre [185]. In letzterem Fall sollten mögliche systematische Differenzen zwischen den Beobachtern in Betracht gezogen werden, z.B. ein abweichendes Verständnis, wie eine Bewegung oder ein Verhalten definiert ist [185]. Eine häufig genutzte Einteilung der möglichen Werte für Kappa bezüglich einer Interpretation findet sich in Tabelle 6.1 [185, 186]. Jedoch warnen manche Autoren, dass Übereinstimmungen mit weniger als 0,8 als kritisch einzustufen sind [187]. Auch wenn Cohen's Kappa von manchen Autoren kritisiert wird, bietet es doch eine einfache Methode, um grundlegende Aussagen über die Übereinstimmung einer Auswertung zweier Beobachter zu treffen [178, 188]. Es bietet damit einen Mehrwert gegenüber einer ausschließlichen Angabe von prozentualen Übereinstimmungen [178, 188].

Tabelle 6.1: Werte für Cohen's Kappa. Mögliche Interpretation eines berechneten Wertes für Cohen's Kappa [185, 186]

Interpretation von Cohen's Kappa	
<0	Geringere Übereinstimmung als zufällig zu erwarten
0,01 - 0,20	Geringe Übereinstimmung
0,21 - 0,40	Mäßige Übereinstimmung
0,41 - 0,60	Mittlere Übereinstimmung
0,61 - 0,80	Erhebliche Übereinstimmung
0,81 - 0,99	Nahezu perfekte Übereinstimmung

Nach der Studie von Burghardt et al. aus dem Jahr 2012 analysierten Freeberg et al. 2024 erneut beispielhaft den Anteil an Artikeln in fünf Journals aus dem Bereich der Verhaltensforschung am Tier, die Informationen zu Verblindung, leOR und laOR enthielten [179]. Trotz einer verbesserten Gesamtquote enthielten weiterhin nur etwa die Hälfte der Artikel in diesen Journals entsprechende Angaben [179].



## 6.4 Verhaltensbeobachtung durch Technologie

### 6.4.1 „Artificial intelligence“ in der Verhaltensforschung

Der technische Fortschritt beeinflusst zunehmend die Methoden und Vorgehensweisen in der Verhaltensforschung [174]. Menge, Art und Geschwindigkeit der Datengenerierung und -auswertung haben sich deutlich erhöht [174]. Diese großen Datensätze werden regelmäßig als „Big Data“ bezeichnet [174]. In der Verhaltensforschung kann inzwischen mit Algorithmen gearbeitet werden, die anstelle eines menschlichen Beobachters automatisiert Daten zu Verhaltensweisen aus Videoaufnahmen generieren können [174].

Derzeit wird intensiv an Systemen aus dem Bereich der „artificial intelligence“ (AI) gearbeitet, um neue Methoden zur Beobachtung und Analyse von Verhaltensweisen und Bewegungen zu ermöglichen [189]. Der Bereich „machine learning“ (ML) stellt einen Teilbereich der AI dar [190, 191]. Der Fokus dieses Teilbereiches liegt dabei auf dem Aspekt des Lernens [190]. Durch das Erkennen von Mustern in Rohdaten soll die AI sich selbstständig verbessern, sozusagen neues Wissen erwerben [191]. Sie soll durch Erfahrung und Daten „lernen“ [191]. Unterschieden werden hierbei verschiedene Varianten des Lernens: „supervised“, „unsupervised“, „semisupervised“ und „reinforcement“, abhängig von der Herangehensweise und der zur Verfügung gestellten Informationen [190]. Eine detaillierte Beschreibung der vier Lernweisen findet sich bei Choi et al. [190].

Als „deep learning“ (DL) wird wiederum ein Teilbereich des ML bezeichnet [190, 191]. Die ursprüngliche Idee von DL-Netzwerken basierte grundlegend auf der Imitation neuronaler Netzwerke, ähnlich denen im menschlichen Gehirn [192]. Daher stammt auch der Ausdruck „artificial neural networks“ (ANN), welcher noch immer in Verwendung ist [192]. Inzwischen sind zusätzlich mathematische und statistische Konzepte in die Entwicklung von DL-Systemen eingeflossen [192].

„Deep convolutional networks“ (auch „Deep convolutional neural networks“, DCNN) stellen eine Unterform des DL dar und werden vor allem zur Objekterkennung in Bildmaterial verwendet [190]. Eine von Wissenschaftlern oft verwendete DCNN Software ist „DeepLabCut“ (DLC) [193, 194]. Seit der Veröffentlichung im Jahr 2018 wurde das frei verfügbare Programm über 670.000 mal heruntergeladen (Stand Mai 2024) [193]. Die Software wird in verschiedenen Bereichen der Forschung genutzt um Bewegungen zu verfolgen und Verhaltensweisen zu erforschen [193–195].

### 6.4.2 DeepLabCut

DeepLabCut ist eine sogenannte „markerless pose estimation software“ [194]. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Software Punkte am Körper eines sich bewegenden Individuums in einer Videoaufnahme identifizieren kann, ohne dass diese Punkte am realen Tier markiert werden müssen [194, 196]. Stattdessen können die zu verfolgenden Punkte durch einen Menschen auf Bildern eines Trainingssets (aus Videoaufnahmen extrahierte beispielhafte Bilder) markiert („gelabeled“) werden [196]. Die Software wird dann anhand dieses Trainingssets trainiert und ist im Anschluss in der Lage, diese Punkte in einem (unbekannten) Video zu verfolgen [196]. Die Analyse der Videos erfolgt dabei Bild für Bild („frame by frame“), und entsprechend ist auch die Ausgabe der Daten für jeden verfolgten Punkt in Form von Koordinaten für jedes einzelne Bild strukturiert [196]. Die Software wurde darauf ausgelegt, dass sie für Wissenschaftler verschiedenster Bereiche nutzbar ist [196]. Daher stellen die Entwickler eine schrittweise Anleitung zur Nutzung zur Verfügung [196].

DeepLabCut ist ein „deep convolutional network“ [194]. Seine Funktion basiert auf Algorithmen für die Erkennung von Objekten und der semantischen Segmentierung [194]. Die Grundlage für seine Funktionsfähigkeit wird gebildet, indem eine Version eines bereits bestehenden neuronalen Netzwerks zur Bildklassifikation, „ResNets“, verwendet wird [194, 197]. „ResNets“ steht hierbei für „residual networks“, einem Computermodell eines neuronalen Netzwerks, das speziell für exakte Bildanalysen bzw. Objekterkennung entwickelt wurde [197, 198]. Dieses verwendete Netzwerk wurde wiederum an einer speziellen Datenbank für Bildmaterial (vor)trainiert, „ImageNet“ [194, 198]. Die Datenbank ImageNet enthält zahlreiche Bilder, welche ursprünglich von Menschen in Kategorien klassifiziert wurden, und dient u.a. speziell der Entwicklung und dem Training von Bilderkennungsmodellen [198, 199]. Anstelle einer Klassifizierung am Ende der Bildverarbeitung, wie bei „ResNets“, nutzt DeepLabCut jedoch eine Art der Dekonvolution [194]. Ziel hierbei ist es, eine höhere Auflösung des Bildes zu erzeugen und genaue Positionsinformationen für jeden einzelnen Punkt des Bildes in Form einer Wahrscheinlichkeitsdichte zu erhalten [194]. Für jeden gelabelten Punkt existiert diese Wahrscheinlichkeitsdichte und dient als eine Art Nachweis („evidence“), dass der verfolgte Punkt sich tatsächlich an dieser Stelle befindet [194].

DLC kann entsprechend den Bedürfnissen des Nutzers fallspezifisch trainiert werden [194]. Dafür wird dem Netzwerk neues Material zur Verfügung gestellt, in der Regel Beispielbilder, in denen die gesuchten Punkte durch einen Menschen markiert wurden [194]. Anhand des neuen Trainingssets, erfolgt eine Umstrukturierung

des Netzwerkes, das heißt, es „lernt“, einem entsprechend neuen Punkt anhand der vorgegebenen „frames“ hohe Wahrscheinlichkeiten an den entsprechenden Positionen zuzuweisen und niedrige, wo der Punkt nicht ist [194]. Die Lokalisation eines Punktes durch DLC erfolgt dementsprechend indem die Region mit der höchsten Wahrscheinlichkeit identifiziert wird, an der sich ein Punkt befinden kann [194]. Indem die Amplitude des Maximums des sich erstreckenden Bereiches berechnet wird, ergibt sich ein Wert, der die Sicherheit, dass sich der Punkt hier befindet, beschreibt („likelihood“) [194]. Ist die „likelihood“ für einen Punkt zu gering, so können die Daten für diesen Punkt zu diesem Zeitpunkt des Videos aus dem generierten Datenset mit Koordinaten ausgeschlossen werden [194]. DeepLabCut sowie ergänzende und erweiternde Software werden beständig weiterentwickelt und verbessert, beispielsweise mit der Möglichkeit, mehrere Tiere innerhalb eines Videos zu identifizieren und zu tracken [200].

## 7. Publizierte Studienergebnisse

Es folgt die Publikation "Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus"

Die Veröffentlichung erfolgte am 08. September 2023 im Journal *Animals*.

Die Supplemente der Veröffentlichung befinden sich in Anhang 15.1.



## Article

# Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus

Stephanie C. Süß <sup>1</sup>, Julia Werner <sup>1</sup>, Anna M. Saller <sup>1</sup>, Larissa Weiss <sup>1</sup>, Judith Reiser <sup>1</sup>,  
Janie M. Ondracek <sup>2</sup>, Yury Zablotzki <sup>3</sup>, Sandra Kollmansperger <sup>4</sup>, Malte Anders <sup>4</sup>, Heidrun Potschka <sup>5</sup>,  
Benjamin Schusser <sup>6</sup>, Thomas Fenzl <sup>4</sup> and Christine Baumgartner <sup>1,7,\*</sup>

- <sup>1</sup> Center for Preclinical Research, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Bavaria, Germany; stephanie.suess@tum.de (S.C.S.); julia.werner@tum.de (J.W.); anna.saller@tum.de (A.M.S.); larissa.weiss@tum.de (L.W.); judith.reiser@tum.de (J.R.)
- <sup>2</sup> Chair of Zoology, TUM School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, 85354 Freising, Bavaria, Germany; janie.ondracek@tum.de
- <sup>3</sup> Clinic for Swine, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, 85764 Oberschleißheim, Bavaria, Germany; y.zablotzki@med.vetmed.uni-muenchen.de
- <sup>4</sup> Clinic for Anesthesiology and Intensive Care, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 Munich, Bavaria, Germany; s.kollmansperger@outlook.de (S.K.); malteanders@gmail.com (M.A.); thomas.fenzl@tum.de (T.F.)
- <sup>5</sup> Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Bavaria, Germany; potschka@pharmtox.vetmed.uni-muenchen.de
- <sup>6</sup> Reproductive Biotechnology, TUM School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University of Munich, 85354 Freising, Bavaria, Germany; benjamin.schusser@tum.de
- <sup>7</sup> Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Bavaria, Germany
- \* Correspondence: christine.baumgartner@tum.de



**Citation:** Süß, S.C.; Werner, J.; Saller, A.M.; Weiss, L.; Reiser, J.; Ondracek, J.M.; Zablotzki, Y.; Kollmansperger, S.; Anders, M.; Potschka, H.; et al. Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus. *Animals* **2023**, *13*, 2859. <https://doi.org/10.3390/ani13182859>

Academic Editors: Gabrielle C. Musk and Peter White

Received: 20 July 2023

Revised: 28 August 2023

Accepted: 7 September 2023

Published: 8 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Chicken embryos are currently being increasingly used in various areas of research but are frequently not covered by animal protection legislation. In the food industry, it is often even common practice to kill male embryos because they are of no economic use. In both cases, there is a lack of knowledge about the sentience of these chicken embryos, especially their ability to perceive pain. The purpose of this exploratory study was to investigate whether—and if so, on which developmental day—a chicken embryo shows a behavioral change or a specific response to a noxious stimulus, both of which would be indicative of functioning nociception. Two complementary approaches were used for the evaluation: human observation and computer-assisted evaluation using a markerless pose estimation software (DeepLabCut). Through a combination of both approaches, it became apparent that developmental day 15 was the earliest stage at which a response to the applied stimulus was detectable. This result thus represents a contribution to the future improvement of animal welfare as it suggests that from developmental day 15 a chicken embryo in the egg has the capacity to show a nocifensive reaction.

**Abstract:** Many potentially noxious interventions are performed on chicken embryos in research and in the poultry industry. It is therefore essential and in the interest of animal welfare to be able to precisely define the point at which a chicken embryo is capable of nociception in ovo. The present part III of a comprehensive study examined the movements of developing chicken embryos with the aim of identifying behavioral responses to a noxious stimulus. For this purpose, a noxious mechanical stimulus and a control stimulus were applied in a randomized order. The recorded movements of the embryos were evaluated using the markerless pose estimation software DeepLabCut and manual observations. After the application of the mechanical stimulus, a significant increase in beak movement was identified in 15- to 18-day-old embryos. In younger embryos, no behavioral changes related to the noxious stimulus were observed. The presented results indicate that noxious mechanical stimuli at the beak base evoke a nocifensive reaction in chicken embryos starting at embryonic day 15.

**Keywords:** behavior; movement; nociception; pain; chicken embryo; development; *Gallus gallus domesticus*

## 1. Introduction

The behavior of birds can profoundly differ from the behavior of mammals, especially in terms of indications of pain [1]. For a long time, birds were not believed to feel pain [1]. At present, it is generally accepted that birds are capable of nociception and can feel pain [1,2]. Several studies have established that birds have mechanothermal, mechanical and thermal nociceptors with high stimulus thresholds [2,3]. Furthermore, peripheral and central processing of a potentially noxious stimulus in birds occurs in a similar manner to that in mammals [4]. Raja et al. defined pain as an aversive experience of an individual that includes both sensory perception and emotional aspects [5]. This experience may be caused by a potential or actual lesion of the tissue [5]. Nociception, on the other hand, is described as the detection of a potentially damaging stimulus by primary sensory neurons and its processing in the nervous system [5,6]. The inability to communicate does not exclude the possibility that pain is felt, for example, by animals or neonates [1,5]. Another definition of pain more suitable for assessing pain in animals includes changes in species-specific behavior as a possible consequence of a painful experience [7]. Because pain is a subjective experience, its assessment is difficult in humans and is even more challenging in animals [1,5]. Detection and quantification of pain in animals involves inference from parameters associated with pain in humans [1].

Birds show only subtle behaviors of discomfort or pain due to the disadvantage of showing weakness in a social group or as a prey species in general as well as the potential predominance of the flight reflex [8]. In addition, bird behavior varies greatly among species and individuals, making it necessary to closely examine the typical behavior of the observed individual. This makes it possible to assess deviations in typical behavior as a sign of pain [9]. Although pain-associated behavior is difficult to identify, its major advantage is that it can be observed immediately and noninvasively [3,9]. This makes behavioral observation an essential part of a comprehensive pain assessment in birds.

Behavioral studies have been conducted in a variety of avian species [10]. Many of these studies used chickens (*Gallus gallus domesticus*) and evaluated nociceptive responses to procedures that are assumed to be painful or elicit discomfort [10,11]. The typical behavior of chicken embryos has long attracted scientific interest [10,11]. In the 1960s, the motility of chicken embryos was intensively studied. Movements and motility patterns, along with other aspects, were observed from days 3.5 to 20 of incubation [12–15]. In contrast, little is known about nociception in the chicken embryo or about nocifensive behavioral responses. According to current understanding, nociception in chicken embryos does not occur before the seventh day of incubation [16–18].

The results presented are part of a comprehensive study investigating the developmental day at which chicken embryos are capable of nociception and pain perception. The aim of the present part III of the study was to evaluate the acute behavioral responses of chicken embryos at different developmental stages to a noxious mechanical stimulus. The markerless pose estimation software DeepLabCut (DLC) and manual observations were used to analyze embryonic behavior [19–21]. In addition, cardiovascular [22] and electrophysiological [23] parameters were investigated in parts I and II of the comprehensive study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and Incubation

Chicken embryos from ED9 to ED18 were analyzed. An overview of the experimental groups is provided in Table 1. Fertilized Lohman Selected Leghorn eggs were obtained from the Technical University of Munich (TUM) Animal Research Centre, Thalhausen. Eggs were disinfected (Röhnfried Desinfektion Pro, Dr. Hesse Tierpharma GmbH & Co., Ltd. KG, Hohenlockstedt, Germany), weighed and stored in a refrigerator at 15 °C until use. The maximum storage time from the day of laying until the start of the incubation was seven days. Before incubation, the eggs were placed at room temperature for 24 h. On the day of incubation, eggs were transferred at 8:30 am into a standard incubator (HEKA

Favorit-Olymp 192 Spezial, HEKA-Brutgeräte, Rietberg, Germany) and incubated under the following conditions: 37.8 °C temperature and 55% humidity. The eggs were turned six times a day until fenestration on ED3. The first day of incubation was defined as ED0.

**Table 1. Number of chicken embryos.** Overview of the number of chicken embryos analyzed on each embryonic day and the sex distribution.

	ED9	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18	ED18 w/ Lido
Amount of embryos ( <i>n</i> )	10	10	10	16	16	16	16	16	5
Sex male/female	5/5	3/7	5/5	9/7	7/9	7/8	7/9	7/9	2/3

On ED3, eggs were placed horizontally for two minutes, and 5–7 mL of albumin was withdrawn through a small hole at the pointed pole using a cannula. A small window was cut in the top of the eggshell, and 0.5 mL of penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin/mL, P4333–100 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added. Eggs were sealed with plastic film and tape. With the eggs in a horizontal position, the incubation proceeded until the desired embryonic day [24].

At the end of the experiments, the embryos were euthanized by an intravenous injection of pentobarbital-sodium (Narcoren, 16 g/100 mL, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany; ED9: 0.05 mL, ED12 to ED15: 0.1 mL and ED16 to ED18: 0.2 mL), followed by decapitation. Afterward, the sexes of the ED12 to ED18 embryos were identified macroscopically by the assessment of the gonads. For the ED9 embryos, sexing was performed with PCR of genomic DNA samples isolated from pectoral and wing muscle. Screening was performed according to an established protocol [25] using primers targeting the Z chromosome [5' AAGCATAGAAACAATGTGGGAC 3' (forward) and 5' AACTCTGTCTGGAAGGACTT 3' (reverse)] and female-specific primers targeting the W chromosome [5' CTATGCCTACCACMTTCCTATTTGC 3' (forward) and 5' AACTCTGTCTGGAAGGACTT 3' (reverse)]. The expected lengths of the DNA fragments were 250 bp and 375 bp, respectively, for female embryos and 250 bp for male embryos. An overview of the sex ratio in each ED is shown in Table 1.

## 2.2. Preparation Process

All experiments were performed between 9:00 am and 7:30 pm by the same two persons to standardize the procedure. To keep the environmental conditions as similar as possible to typical brooding conditions, experiments were conducted in a special heated chamber. The chamber was equipped with a heat mat (ThermoLux Wärmeunterlage, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Germany), a heat lamp (Wärmestrahlergerät, Taschenlampenwerk ARTAS GmbH, Arnstadt, Germany) and an air humidifier (Series 2000 Luftbefeuchter HU4811/10R1, Philips, Amsterdam, The Netherlands). Humidity was kept at a constant level of 55.5% ± 4.5. Additionally, the eggs were embedded in warm (38.0 °C) Armor Beads (Lab Armor Beads™, Sheldon Manufacturing, Cornelius, NC, USA). In this manner, the inner egg temperature was kept at 37.9 °C ± 0.9 during the entire experiment. To observe the entire embryo, the window in the eggshell was enlarged. Next, the chorioallantoic membrane (CAM) was carefully cut open and removed from the field of view. If necessary, blood vessels were ligated to prevent bleeding. However, to the extent possible, ligating or cutting vessels was avoided to prevent disruption of blood circulation. To gain access to the embryo and improve visibility, the amnion was carefully opened. A Desmarres lid retractor (Fuhrmann GmbH, Much, Germany) was carefully placed underneath the beak of the embryo to ensure beak visibility. In the case of ED9 embryos, a small wire loop was used.

### 2.3. Experimental Setup

All experiments were filmed with a camera (Panasonic LUMIX DC-G110V with a Panasonic Lumix G 30 m lens, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan; for ED9 to ED16: HOYA SUPER PRO1 Revo Filter SMC Cir-PL, Kenko Tokina Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a frame rate of 50 frames per second.

After preparation, a resting period of three minutes was allotted. Baseline behavior was recorded for two (ED15 to ED18) or three (ED9 to ED14) minutes; subsequently, two stimuli were applied in a randomized order. The stimuli used were a noxious mechanical stimulus (*Pinch*) using a manual instrument and a light touch (*Touch*) as a negative control. Both were applied at the base of the beak. For the ED15 to ED18 embryos, a mosquito clamp (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) was used to administer the stimulus. To better monitor the applied force, a mosquito clamp combined with an analgesia meter (Rodent Pincher Analgesia Meter, Bioseb, Vitrolles, France) was used for experiments conducted with ED12 to ED14 embryos. Stimulus 1 (*Pinch* or *Touch*) was administered, followed by an observation duration of three minutes. After a second baseline period, stimulus 2 (*Touch* or *Pinch*) was administered, followed by another three minutes of observation. Because of their small size, microsurgical anatomical forceps (Fine Science Tools, Foster City, USA) had to be used to administer the stimulus to ED9 embryos. An additional group of ED18 embryos (ED18 w/Lido) was injected with 0.02 mL of lidocaine (Xylocitin® 2%, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Germany) in the upper and lower beak region five minutes before the first baseline. Experiments were then performed according to the above protocol.

### 2.4. Analyses: Hardware, Software and Statistical Analyses

All videos were edited in the same way using the “daVinci Resolve” software (Blackmagic Design Pty. Ltd., Port Melbourne, Australia) before analysis. For each embryo, four single videos were cut referring to the sections of the experimental design: *Baseline Pinch*, *Baseline Touch*, *Post Pinch* and *Post Touch*. An overview of the experimental procedure is shown in Figure 1.

### 2.5. DeepLabCut

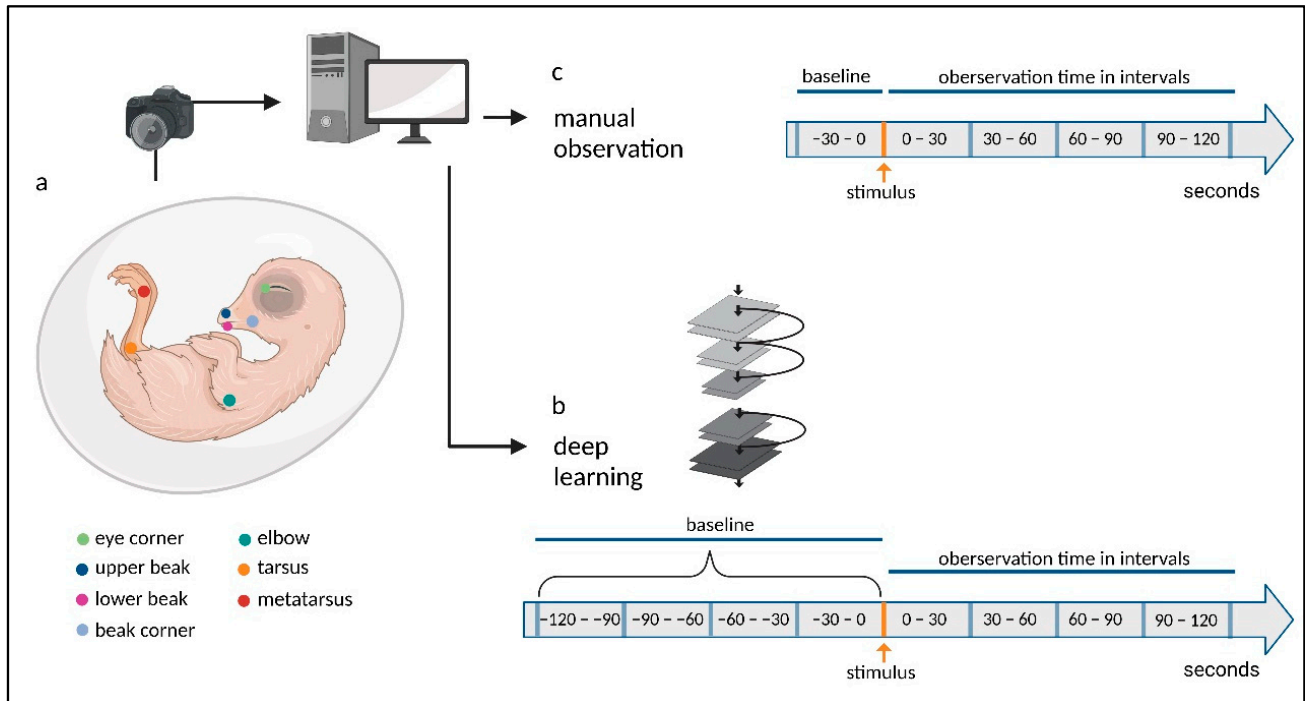
To track the body parts of the embryo, the Python-based markerless pose estimation software DLC (version 2.2.1.1) [19,21] was used on a computer (MSI MAG Infinite 11TC-1222AT, Intel Core i7-11700F, 16 GB RAM, nVidia GeForce RTX3060, Micro-Star Int'l Co., Ltd., New Taipei City, Taiwan). The neural network was trained for each ED individually with video footage according to the protocol provided by the developers [21]. Manual labeling was always performed by the same person. The training was performed with the default settings and using a ResNet-50-based neural network [26,27]. A test error below 8.5 was obtained for every ED. After the model training was completed, the four experimental videos (*Baseline Pinch*, *Baseline Touch*, *Post Pinch* and *Post Touch*) were analyzed for each embryo. For each labeled body part, DLC created three outputs for each frame of the video: an x coordinate, a y coordinate and a likelihood value. These values were analyzed with custom-written code using MATLAB (MATLAB Version: 9.12.0.1927505 (R2022a) Update 1, MathWorks). In all cases, a likelihood value cutoff of 0.75 was used.

#### 2.5.1. Visualization of the Data Clusters

In the analysis, the focus was on the following body parts:

- Beak;
- Head;
- Limbs;
- Stationary points on the egg, the Desmarres lid retractor, and the wire loop (for ED9) were used as reference controls.





**Figure 1. Flowchart of the experimental procedures.** (a) Recordings of the embryo were collected in ovo, and video data were transferred to a computer for editing. The body parts of chicken embryos tracked by DLC are labeled in the schema. (b) The neural network was trained, and the video material was analyzed according to the timeline. (c) The video material was manually analyzed according to the timeline. (Created with BioRender.com, accessed on 6 September 2023).

As a first step, the labeled data clusters for each analyzed body part were visualized in the x–y coordinate space. This enabled refinement of the dataset through identification of outliers or mislabeled body parts. The videos were then checked for errors, and if any real outlier was found in a frame, its value was manually excluded.

#### Distance between the Upper and Lower Beak

The distance between the upper and lower boundaries of the beak was calculated in terms of the Euclidian distance  $d$  between two points:

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

where  $x_u$  is the x coordinate of the upper beak label,  $x_l$  is the x coordinate of the lower beak label,  $y_u$  is the y coordinate of the upper beak label and  $y_l$  is the y coordinate of the lower beak label. The Euclidian distance was calculated (in pixels) for every frame of the video.

#### Angle between the Upper and Lower Beak

The angle between the upper and lower beak was computed by calculating the angle  $\alpha$  between two lines,  $P_0$  to  $P_1$  and  $P_0$  to  $P_2$ , where  $P_0$  is the fulcrum between the beak parts,  $P_1$  is the upper beak point and  $P_2$  is the lower beak point. The angle was then calculated as follows:

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

where  $\text{atan2}$  is the four-quadrant inverse tangent,  $\det$  is the matrix determinant,  $\text{dot}$  is the dot product, and  $n_2, n_1$  are the Euclidean normalized vectors for  $P_0$  to  $P_1$  and  $P_0$  to  $P_2$ , respectively. The angle between the upper and lower beak was calculated for all frames of the video in radians and then converted to degrees.

### Movement

The movement of the body parts of interest was calculated in terms of the Euclidean distance  $d$  between identical labels across consecutive frames:

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

where  $x_{f1}$  is the x coordinate in frame 1,  $x_{f2}$  is the x coordinate in frame 2,  $y_{f1}$  is the y coordinate in frame 1 and  $y_{f2}$  is the y coordinate in frame 2. The distances were calculated for all consecutive frames. From ED12 to ED18, movements of the medial eye corner, elbow and metatarsus were analyzed. For the body movements on ED9, the tarsus (instead of the metatarsus) was used to assess leg movement, as the tissue of the metatarsus was translucent and prone to errors in tracking.

#### 2.5.2. Analysis

To simplify the analyses, 30 s intervals were evaluated. For each parameter, i.e., *Beak Distance*, *Beak Angle*, *Movement Eye Corner*, *Movement Elbow* and *Movement Metatarsus*, the sum of the 1500 frame values of the interval was calculated. In Post Stimulus, this resulted in four intervals: 0–30, 30–60, 60–90 and 90–120 s. The beginning of the first poststimulus interval was defined as the moment from which the clamp was no longer in contact with the beak. The median of the four 30-s intervals prior to the stimulus was considered the baseline. Missing values, which arose after the exclusion of low likelihood values, were manually imputed. For each missing value series, the median was determined for half of the adjacent data and used in place of the missing value. If more than 5% of the data in an interval were missing, the interval was excluded from the analysis. Due to a lack of visibility, one ED14 embryo and one ED18 embryo were completely excluded from the DLC analysis. A precise overview of the number of datasets ultimately included in the analysis is provided in Table S1.

Due to the presence of repeated measures, generalized linear mixed effects models with the individual embryo as a random effect were chosen for analysis. Due to the violation of numerous model assumptions (normality of residual distribution, heteroscedasticity of residuals, heterogeneity of variances between groups and presence of outliers), only robust linear mixed-effects models were applied for all analyses (R package-robustlmm). All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means (R package-emmeans) with Tukey's  $p$  value correction for multiple comparisons. The results with a  $p$  value  $< 0.05$  were considered statistically significant. Data analysis was performed using R 4.2.1 (23 June 2022). Detailed information about the statistical analyses, including the corresponding effect size for each reported  $p$  value, can be found in Table S2.

#### 2.6. Manual Observation

The same video footage as used in the DLC analyses was used for manual observations. Since preliminary observations and data from the DLC analyses indicated that changes in beak position were frequent after *Pinch*, manual observations focused on beak movements. Four different patterns of beak movements were identified from the video material:

- *Beak Shift*—a small horizontal shift of the upper and lower beaks against each other;
- *Mandibulation*—a small vertical opening of the beak, often executed several times, and reminiscent of a chewing movement;
- *Beak Opening*—single, swift, vertical opening of the beak;
- *Wide Beak Opening*—single, wide, vertical opening of the beak, accompanied by a characteristic tongue movement.

In an analogous approach to the one described above, the baseline and poststimulus observations were divided into intervals of 30 s. For manual observations, the 30 s before

the stimulus were used as a baseline. For each interval, the occurrences of the described beak movements were counted.

### 3. Results

#### 3.1. Beak Movements in Response to a Noxious Stimulus

To analyze the movements of chicken embryos, the markerless pose estimation software DLC was used. The angle (*Beak Angle*) and distance (*Beak Distance*) between the upper and lower beak were calculated to reflect the opening of the beak as a potential response to a noxious mechanical stimulus applied at the base of the beak. The mechanical stimulation of the beak led to a change in the beak position at embryonic day (ED) 9 and ED12; thus, evaluation with DLC was distorted and could not be interpreted. At ED13 and ED14, *Beak Distance* did not differ between any time intervals during the two minutes after the control touch stimulus (hereafter, *Post Touch*) and the time intervals during the two minutes after the noxious pinch stimulus (hereafter, *Post Pinch*) (Figure S1). At ED15, significant increases in *Beak Distance* as a response to *Pinch* were detected (Figure 2). Additionally, in ED15 embryos, beak movements *Post Pinch* increased significantly over the first 120 s compared to *Baseline Pinch* and over the first 90 s compared to *Post Touch*. On ED16, ED17 and ED18, a significant increase in *Beak Distance* was observed over all time intervals *Post Pinch* compared to *Baseline Pinch* and *Post Touch*. The greatest increase in *Beak Distance* occurred during the first 30 s of *Post Pinch*. The group of ED18 embryos that received an injection of the local anesthetic lidocaine (ED18 w/Lido) did not exhibit reduced beak movements compared to same-age embryos that did not receive the local anesthetic (Figure S2). *Beak Distance* was still significantly increased in ED18 w/Lido in the first 30 s of *Post Pinch* ( $p < 0.0001$ ).

*Beak Angle* results are displayed in the Supplementary Information (Figure S3). Briefly, *Beak Angle* showed a similar pattern of changes as *Beak Distance*. Additionally, significant increases in *Beak Angle* during *Post Pinch* were observed from ED15 onward.

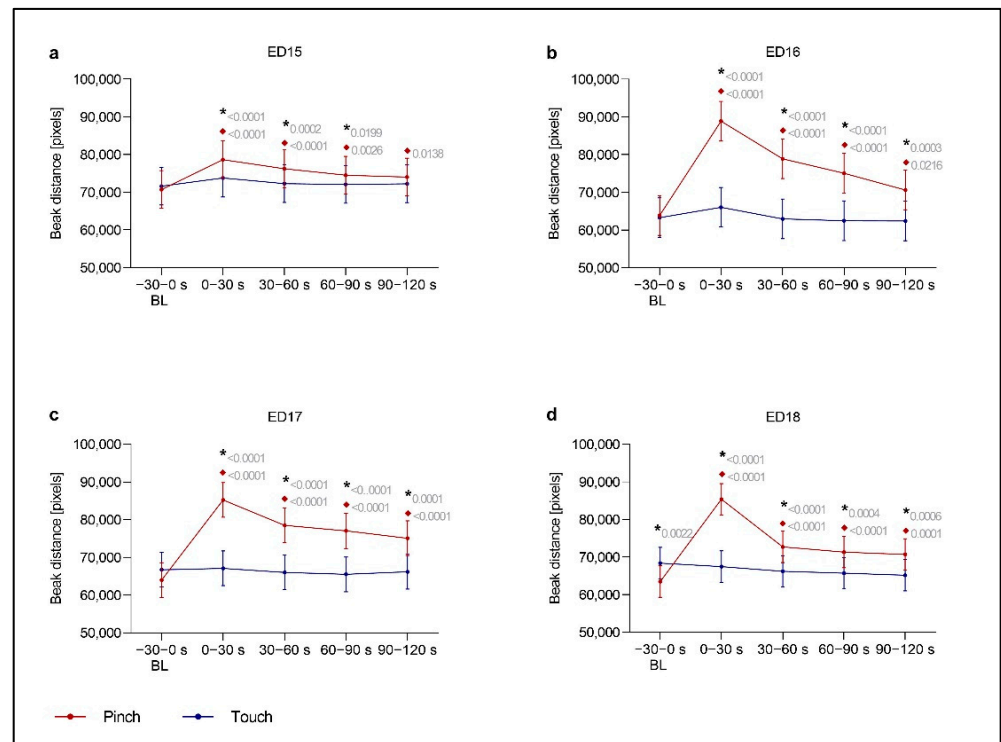
#### 3.2. Head Movements in Response to a Noxious Stimulus

The medial eye corner was tracked to analyze the head movements of chicken embryos. Changes were particularly observed on ED13 and ED16 to ED18 in the first 30 s of *Post Pinch*. On these days, the embryos showed a significant increase in head movements after *Pinch* compared to after *Touch* (ED13:  $p = 0.0254$ ; ED16:  $p = 0.0381$ ; ED17:  $p = 0.026$ ; ED18:  $p < 0.0001$ ) and during *Baseline Pinch* (ED13:  $p = 0.0256$ ; ED16:  $p = 0.0001$ ; ED17:  $p < 0.0001$ ; ED18:  $p < 0.0001$ ). At ED12, head movements increased significantly at 30–60 s after *Pinch* compared to those 30–60 s after *Touch* ( $p = 0.0372$ ). At ED14, head movements also increased significantly in the first 30 s after the stimulus compared to those in the corresponding baseline period. These movements were observed after both stimuli (*Pinch*:  $p = 0.0153$ ; *Touch*:  $p = 0.0069$ ). In addition, a significant difference between head movements in response to *Pinch* and those in response to *Touch* was observed at 30–60 s after the stimulus ( $p = 0.0175$ ). Head movements were significantly reduced in ED18 w/Lido embryos in the first 30 s of *Post Pinch* compared to those of ED18 embryos in the same period ( $p < 0.0001$ ). Head movements on ED15 to ED18 are displayed in Figure 3, while data on ED9, ED12 to ED14 and ED18 w/Lido embryos are provided in the Supplementary Information (Figures S4 and S5).

#### 3.3. Limb Movements in Response to a Noxious Stimulus

To track limb movements, the movements of the *Elbow*, *Metatarsus* and *Tarsus* (ED9) were analyzed. Significant differences in limb movements between *Baseline Pinch* and *Post Pinch* and between *Post Pinch* and *Post Touch* were observed only on ED18 (Figures S6 and S7). An increase in elbow movements was observed between *Baseline Pinch* and *Post Pinch* ( $p = 0.0023$ ) as well as between *Post Pinch* and *Post Touch* ( $p = 0.0096$ ) during the first 30 s after the stimulus. Regarding metatarsus movements, ED18 embryos showed a significant increase between *Baseline Pinch* and *Post Pinch* ( $p < 0.0001$ ) as well as between *Post Pinch* and

*Post Touch* ( $p = 0.0002$ ) during the first 30 s after the stimulus. For ED18 w/Lido embryos, no significant differences in limb movements were observed between *Baseline* and the first 30 s of *Post Stimulus*. There was also no significant difference between the ED18 embryos and the ED18 w/Lido embryos. Other significant changes in limb movements were observed at specific time intervals during development.



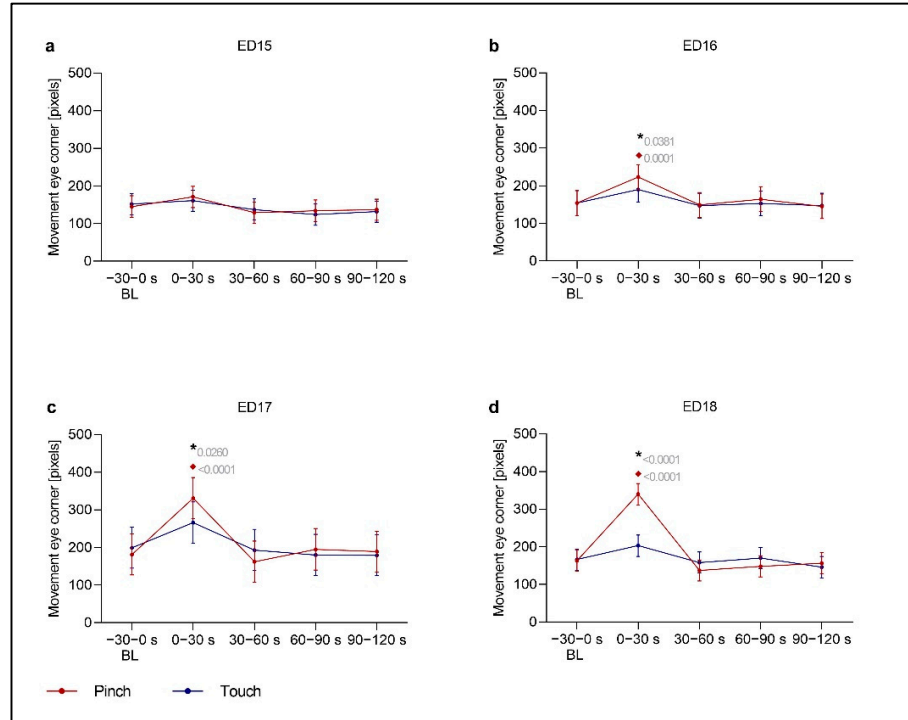
**Figure 2. Beak Distance.** This variable was defined as the distance between the upper and lower beak of embryos. It was measured at (a) ED15 ( $n = 16$ ), (b) ED16 ( $n = 16$ ), (c) ED17 ( $n = 16$ ) and (d) ED18 ( $n = 15$ ) before and after application of a control (*Touch*) or noxious stimulus (*Pinch*). The total distance in pixels across 30 s intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm 95\%$  confidence intervals at the following 30 s intervals from Baseline (BL) to post-stimulation, with stimulation occurring at 0 s:  $-30-0$ ,  $0-30$ ,  $30-60$ ,  $60-90$  and  $90-120$  s. Robust linear mixed effects were applied for all analyses. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey's  $p$  value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ◆ Significant difference from baseline.  $p$  values shown.

### 3.4. Characterization of Beak Movements in Response to a Noxious Stimulus

In particular, DLC analysis identified changes in beak movement during *Post Pinch* in embryos from ED15 to ED18. To characterize beak movements in further detail, manual observations were performed. The focus of the manual observations was on four behaviors: *Beak Shift*, *Mandibulation*, *Beak Opening* and *Wide Beak Opening*. An overview of the percentage of animals that exhibited each behavior at specific time intervals is shown in Table 2. In addition, the counts of each behavior are shown in Figures S8–S11.

*Beak Opening* was rarely displayed during *Baseline* and was observed in only 10.0% of animals from ED9 to ED18. *Beak Opening* was particularly rare on ED9 and ED12 to ED14. Before ED12, a maximum of 10.0% of animals exhibited this behavior within a single time interval; up to ED14, a maximum of 20.0% of animals exhibited this behavior within a single time interval. Starting from ED15, an increasing frequency (31.3%) of *Beak Opening* was observed after the application of the noxious stimulus. At ED16, 87.5% of embryos showed *Beak Opening* in the first 30 s of *Post Pinch*. Additionally, 50.0% of ED17 embryos

and 62.5% of ED18 embryos showed this behavioral response to *Pinch*. During these days, at least twice as many embryos showed *Beak Opening* during *Post Pinch* as those during *Post Touch*.



**Figure 3. Eye Corner Movement.** This variable was used to detect head movements of embryos at (a) ED15 ( $n = 16$ ), (b) ED16 ( $n = 16$ ), (c) ED17 ( $n = 16$ ) and (d) ED18 ( $n = 15$ ) before and after application of two stimuli (*Touch* and *Pinch*). The total distance in pixels across 30 s intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm 95\%$  confidence intervals at the following 30 s intervals from Baseline (BL) to post-stimulation, with stimulation occurring at 0 s:  $-30-0$ ,  $0-30$ ,  $30-60$ ,  $60-90$  and  $90-120$  s. Robust linear mixed effects were applied for all analyses. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey’s  $p$  value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ♦ Significant difference from baseline.  $p$  values shown.

**Table 2. Percentage of chicken embryos showing beak movements.** Overview of the percentage of chicken embryos that showed beak movements (*Beak Shift*, *Mandibulation*, *Beak Opening* or *Wide Beak Opening*) during the 30 s before (*Baseline*) and 30 s after (*Post*) the stimulus.

		ED9 $n = 10$		ED12 $n = 10$		ED13 $n = 10$		ED14 $n = 16$		ED15 $n = 16$		ED16 $n = 16$		ED17 $n = 16$		ED18 $n = 16$		ED18 w/Lido $n = 5$	
Amount of embryos [%]		<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>
<i>Beak Shift</i>	<i>Baseline</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	30.0	18.8	25.0	31.3	0.0	18.8	25.0	25.0	31.3	25.0	6.3	40.0	40.0
	<i>Post</i>	0.0	0.0	30.0	30.0	20.0	20.0	18.8	31.3	31.3	25.0	18.8	18.8	25.0	18.8	31.3	6.3	20.0	60.0
<i>Mandibulation</i>	<i>Baseline</i>	20.0	30.0	40.0	30.0	10.0	50.0	12.5	12.5	37.5	12.5	62.5	25.0	43.8	37.5	31.3	37.5	80.0	80.0
	<i>Post</i>	30.0	20.0	50.0	60.0	50.0	40.0	56.3	56.3	62.5	81.3	68.8	93.8	62.5	87.5	68.8	87.5	80.0	60.0
<i>Beak Opening</i>	<i>Baseline</i>	10.0	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0	6.3	0.0	0.0	6.3	0.0	6.3	6.3	6.3	0.0	0.0	0.0	20.0
	<i>Post</i>	0.0	0.0	00.0	10.0	10.0	20.0	0.0	12.5	12.5	31.3	31.3	87.5	18.8	50.0	18.8	62.5	0.0	20.0
<i>Wide Beak Opening</i>	<i>Baseline</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0
	<i>Post</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	12.5	18.8	6.3	25.0	0.0	81.3	0.0	87.5	0.0	40.0

*Wide Beak Opening*, characterized by visible tongue movement, was observed only sporadically during *Baseline* on all developmental days. This behavior was observed in only one animal each on ED13, ED14 and in ED18 w/Lido embryos during baseline. Moreover, this specific beak movement was not observed during *Post Pinch* and *Post Touch* for ED9 to ED13 embryos and was observed only once during *Post Pinch* on ED14. On ED15 and ED16, this behavior was increasingly observed. A total of 18.8% (ED15) and 25.0% (ED16) of embryos exhibited *Wide Beak Opening* in the first 30 s of *Post Pinch*. A total of 81.3% and 87.5% of embryos on ED17 and ED18, respectively, showed more *Wide Beak Opening* in the first 30 s of *Post Pinch*. However, this behavior was never observed during *Post Touch* or corresponding baseline periods at these ages.

*Beak Shift* was observed from ED12 onward, but it did not appear to be associated with *Pinch*. *Mandibulation* was also observed across all embryonic days. Changes were observed in *Mandibulation* at all times in *Post Pinch* and *Post Touch* and regularly during both baseline periods.

Since *Beak Opening* and *Wide Beak Opening* were the most noticeable *Post Pinch* responses, the focus of comparisons with the additional control group that received local anesthetic (ED18 w/Lido) was on these two movements, as the application of lidocaine reduced these behaviors. In the ED18 w/Lido group, 40.0% of the embryos reacted with *Wide Beak Opening* to the noxious mechanical stimulus; in the ED18 embryos without a lidocaine injection, 87.5% exhibited this behavior. *Beak Opening* was observed in 20.0% of the ED18 w/Lido animals and 62.5% of the untreated ED18 embryos. Neither *Mandibulation* nor *Beak Shift* appeared to be associated with a specific reaction in any time interval, similar to embryos without lidocaine treatment. In other words, no noticeable increase or decrease in these behaviors was observed after a stimulus.

#### 4. Discussion

In this exploratory study, we investigated the movements of chicken embryos in response to a noxious stimulus at different developmental stages. We used DeepLabCut, a Python-based markerless pose estimation software, as well as manual observations to determine their responses.

Recently, the use of artificial intelligence and deep learning systems in behavioral studies has increased, and the availability of free software such as DLC allows such techniques to be used by researchers with less sophisticated programming experience [28–30]. In our study, we trained a model to provide satisfactory accuracy of tracking individual body parts on each embryonic day. One of the major advantages of using the markerless pose estimation software DLC is that it enables unbiased analysis. Calculations of distances are not based on subjective perception by an observer and are therefore quantifiable and reliable. Therefore, deep learning systems in general and DLC in particular offer a means of detecting and classifying behaviors that may not be detectible to the naked eye. However, the DLC analysis did not allow us to distinguish between types of beak movements. Thus, for better differentiation of beak movements, we added manual observation of these movements and identified four different patterns.

Pain behavior in general is influenced by a variety of factors specific to the stimulus or the affected animal. For example, noxious agents can differ in duration (acute or chronic), source (somatic or visceral) and severity (mild to severe), each of which may provoke a different reaction [9,10,31]. Since behavioral responses vary extensively depending on the species and stimulus, any description is valid only for the specifically described case and cannot be transferred to another species without re-evaluation [10]. In our study, we applied an acute mechanical stimulus to the beak base of chicken embryos. The beak of chickens is known to be equipped with nociceptors [32] and therefore represents a pain-sensitive area [11]. The beak has also been reported as the region in chicken embryos where the earliest response to stimuli is observed [33]. Chumak observed reflex movements in the form of flexions of the head on day 7 of incubation in response to pinpricks in the beak region, describing reflexes provoked by external stimuli (isolated movements of the head



or wing) and spontaneous voluntary movements (involving generalized head, trunk and limb movements) [33].

Nociceptive reflexes have evolved as protective mechanisms [34]. A noxious stimulus is transmitted via peripheral nociceptors to the spinal cord and transmitted to motor neurons, resulting in muscle contraction and thus the nociceptive reflex [34–36]. Chumak reported more specific responses, including increased defensive movements, in chicken embryos at ED14/15 but characterized these responses as reflexive [33]. Hamburger and Oppenheim reported that coordinated movements appear around ED17 [14]. Since our study was based solely on observations of movements by chicken embryos, a conclusion regarding whether the observed movements are reflexes or coordinated movements cannot be drawn.

We analyzed the movements of chicken embryos in response to a noxious stimulus applied to the beak from ED9 to ED18. Consistent with the assumption that a response to a stimulus is expected at the site of stimulus application, as was shown for well-innervated regions such as the beak [10], our DLC data for *Beak Angle* and *Beak Distance* showed the most noticeable changes after the stimulus. Both parameters, *Beak Angle* and *Beak Distance*, quantified beak movements. A significant increase in beak movements was detected immediately after *Pinch* from ED15 to ED18. As the increase in beak movements during *Post Pinch* was significant compared to those during *Baseline Pinch* and *Post Touch*, we assumed that the increase in beak movements was a reaction to the noxious stimulus and was not a random movement of the chicken embryos.

Further differentiation of the movements through manual observation revealed that *Beak Opening* (starting on ED16) and *Wide Beak Opening* (starting on ED17) were recurring movements in response to the noxious stimulus. Individual, slow beak openings have been described in connection with the penetration of the air sac membrane shortly before hatching, at the end of day 18 [14]. This description, however, does not match the rapid and clustered movements that we observed following the stimulus. Since these beak openings do not appear to be part of the typical behavior of chick embryos and markedly occurred only after a noxious stimulus, they may represent a nocifensive response by the embryo. Whether this can be interpreted as the presence of pain sensation remains unclear because an experience of pain presupposes consciousness [37], and no indications can be made about this in the context of this part of the study.

Hamburger and Oppenheim also described a behavior that they called beak clapping, which involves rapid opening and closing of the beak in sequences that occurred at irregular intervals [14]. The description and random occurrence of this behavior matches *Mandibulation* in our study. Likewise, the movement was randomly observed across time intervals and had no clear connection to any of the stimuli. However, a similar behavior was observed in adult chickens as a response to low atmospheric pressure stunning before slaughter [38]. In this case, the mandibulation was discussed as a possible sign of reduced welfare or a physiological reaction to hypoxia [38]. As in the other studies, the embryos in our study underwent stress from the opening of the egg, preparation and stimuli. Therefore, it is possible that *Mandibulation* is also a sign of stress in chicken embryos.

Application of the local anesthetic lidocaine did not yield a significant reduction in the beak movements of chicken embryos on ED18 according to the DLC analysis. However, in the manual observations, the application of lidocaine reduced the percentage of embryos that responded to stimuli with *Wide Beak Opening* and *Beak Opening* by approximately half. Furthermore, local anesthetics are known to be effective in birds [39–41] and can be used in chickens, e.g., for spinal anesthesia [42] or brachial plexus blockade [43]. However, there are no reliable empirical data regarding the mode of action of local anesthetics in chicken embryos. Additionally, we emphasize that only a small number of embryos were examined; thus, the results must be interpreted with caution. The inability of local anesthesia to reduce beak movements could also stem from the injection of lidocaine, which itself constitutes a noxious stimulus. In addition, numbness in the beak due to local anesthesia could have

led to behavioral changes [44]. This is supported by the fact that head movements were significantly reduced by applying lidocaine to ED18 embryos.

Overall, stress could not be completely eliminated within the experimental setup; thus, its potential influence on behavior must be considered. The fenestrated egg does not represent a completely typical environment for the embryo because of the increased exposure to environmental influences, such as light. Additionally, the invasiveness of the preparation itself can induce stress, which is known to alter the behavior of birds [9]. We attempted to reduce external influences by standardizing the temperature and humidity during the experiments and adjusting them to match the typical incubation conditions as closely as possible. However, since direct access to the embryo was necessary for stimulation and the embryo had to be visible to assess responses, some stressors were unavoidable.

We were also interested in whether limb movements changed after the noxious stimulus; however, we did not detect any overarching pattern until ED17. Occasional significant differences in limb movements during *Post Pinch* compared to those during *Baseline Pinch* or *Post Touch* were inconsistent over several EDs or time intervals and are therefore likely due to random movements, which have been described previously in the literature [12–14,45–49]. Hamburger and Oppenheim stated that before ED15, the observed leg motility was not connected to any sensory input but appeared randomly due to autonomous cell discharges [15]. Wu et al. counted unilateral and bilateral simultaneous limb movements and found a maximum of movements between ED10 and ED13 for the former and two maxima on ED13 and ED17 for the latter [50]. In the present study, we detected a significant increase in elbow and metatarsal movements during the first 30 s of *Post Pinch* compared to those during the first 30 s of *Baseline Pinch* and *Post Touch* on only ED18, suggesting that these movements may represent an actual response to the noxious stimulus.

## 5. Conclusions

We observed the movements of chicken embryos from ED9 to ED18 before and after noxious stimulation. During *Post Pinch*, the observed movement changes in ED15 to ED18 embryos were most likely a response to the noxious mechanical stimulus and can therefore be interpreted as nocifensive behavior. The results of our current movement analysis in combination with the corresponding results of the cardiovascular changes [22] and the evaluation of the onset of physiological neuronal signals [23] in chicken embryos during this developmental period provide valuable information that enhances our understanding of the development of nociception and pain perception in chickens.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13182859/s1>, Figure S1: Beak Distance ED13/ED14; Figure S2: Beak Distance Lidocaine; Figure S3: Beak Angle; Figure S4: Movement Eye corner ED9/ED12–14; Figure S5: Movement Eye corner Lidocaine; Figure S6: Movement Metatarsus respectively Tarsus (ED9); Figure S7: Movement Elbow; Figure S8: Beak Shift; Figure S9: Mandibulation; Figure S10: Beak Opening; Figure S11: Wide Beak Opening; Table S1: Overview on the number of datasets from DLC included in the final analysis; Table S2: Statistical metrics. All MATLAB analysis code used in this study is available in a public GitHub repository: <https://github.com/ondracej/dlcAnalysisEmbryo> (accessed on 6 September 2023).

**Author Contributions:** Conceptualization, C.B., J.W., A.M.S., J.R., T.F., B.S.; methodology, C.B., J.W., A.M.S., J.R., S.C.S., L.W., S.K., M.A., T.F., B.S., H.P.; software, J.M.O.; validation, C.B., J.W., A.M.S.; formal analysis, J.M.O., Y.Z.; investigation, S.C.S., L.W., A.M.S., J.W., J.R.; resources, C.B., B.S.; data curation, S.C.S., J.W., A.M.S., J.M.O.; writing—original draft preparation, S.C.S.; writing—review and editing, S.C.S., J.W., A.M.S., J.R., J.M.O., S.K., M.A., T.F., B.S., C.B.; visualization, S.C.S., J.W., A.M.S.; supervision, C.B., T.F., B.S., H.P.; project administration, C.B.; funding acquisition, C.B., T.F., B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.



**Funding:** This research was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL, <https://www.bmel.de>, accessed on 6 September 2023) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany, granted by the Federal Office for Agriculture and Food (BLE, <https://www.ble.de>, accessed on 6 September 2023, grant number: 2821HS005).

**Institutional Review Board Statement:** According to Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the German Animal Welfare Law, no ethical approval was required for the use of chicken embryos in the experiments. The experiments were performed in an AAALAC-certified animal facility. All experiments and the euthanasia of embryos were conducted in strict accordance with the institutional Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals and under general animal welfare principles.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank the scientific advisory board including Michael Erhard, Wolf Erhardt, Harald Luksch, Heidrun Potschka, Hans Straka and Britta Wirrer. In addition, the authors thank Marie-Louise Schmid, Johannes Fischer and Hicham Sid for their helpful support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

## References

- Livingston, A. Pain and analgesia in domestic animals. In *Comparative and Veterinary Pharmacology*, 1st ed.; Cunningham, F., Elliott, J., Lees, P., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 159–189. [\[CrossRef\]](#)
- Gentle, M.J. Pain in birds. *Anim. Welf.* **1992**, *1*, 235–247. [\[CrossRef\]](#)
- Paul-Murphy, J.R.; Hawkins, M. Bird-specific considerations: Recognizing pain behavior in pet birds. In *Handbook of Veterinary Pain Management*, 3rd ed.; Gaynor, J.S., Muir, W.W., Eds.; Elsevier Mosby: St. Louis, MO, USA, 2014; pp. 536–554. [\[CrossRef\]](#)
- Douglas, J.M.; Guzman, D.S.-M.; Paul-Murphy, J.R. Pain in birds: The anatomical and physiological basis. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2018**, *21*, 17–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Raja, S.N.; Carr, D.B.; Cohen, M.; Finnerup, N.B.; Flor, H.; Gibson, S.; Keefe, F.J.; Mogil, J.S.; Ringkamp, M.; Sluka, K.A.; et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *Pain* **2020**, *161*, 1976–1982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **2001**, *413*, 203–210. [\[CrossRef\]](#)
- Zimmermann, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol. Scandinavica. Suppl.* **1986**, *554*, 221–233.
- Korbel, R.; Lierz, M. Vögel. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, 2nd ed.; Erhardt, W., Baumgartner, C., Haberstroh, J., Eds.; Schattauer GmbH: Stuttgart, Germany, 2012; pp. 790–834.
- Mikoni, N.A.; Guzman, D.S.-M.; Paul-Murphy, J. Pain recognition and assessment in birds. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2023**, *26*, 65–81. [\[CrossRef\]](#)
- Mikoni, N.A.; Guzman, D.S.-M.; Fausak, E.; Paul-Murphy, J. Recognition and assessment of pain-related behaviors in avian species: An integrative review. *J. Avian Med. Surg.* **2022**, *36*, 153–172. [\[CrossRef\]](#)
- Gentle, M.J. Pain issues in poultry. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2011**, *135*, 252–258. [\[CrossRef\]](#)
- Hamburger, V.; Balaban, M. Observations and experiments on spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. *Dev. Biol.* **1963**, *6*, 533–545. [\[CrossRef\]](#)
- Hamburger, V.; Balaban, M.; Oppenheim, R.; Wenger, E. Periodic motility of normal and spinal chick embryos between 8 and 17 days of incubation. *J. Exp. Zool.* **1965**, *159*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
- Hamburger, V.; Oppenheim, R. Prehatching motility and hatching behavior in the chick. *J. Exp. Zool.* **1967**, *166*, 171–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hamburger, V.; Wenger, E.; Oppenheim, R. Motility in the chick embryo in the absence of sensory input. *J. Exp. Zool.* **1966**, *162*, 133–159. [\[CrossRef\]](#)
- Peters, J.J.; Vonderahe, A.R.; Powers, T.H. The functional chronology in developing chick nervous system. *J. Exp. Zool.* **1956**, *133*, 505–518. [\[CrossRef\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#)

19. Mathis, A.; Mamidanna, P.; Cury, K.M.; Abe, T.; Murthy, V.N.; Mathis, M.W.; Bethge, M. DeepLabCut: Markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 1281–1289. [[CrossRef](#)]
20. Mathis, A.; Warren, R. On the inference speed and video-compression robustness of DeepLabCut. *bioRxiv* **2018**. [[CrossRef](#)]
21. Nath, T.; Mathis, A.; Chen, A.C.; Patel, A.; Bethge, M.; Mathis, M.W. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 2152–2176. [[CrossRef](#)]
22. Weiss, L.; Saller, A.M.; Werner, J.; Süß, S.C.; Reiser, J.; Kollmansperger, S.; Anders, M.; Potschka, H.; Fenzl, T.; Schusser, B.; et al. Nociception in Chicken Embryos, Part I: Analysis of Cardiovascular Responses to a Mechanical Noxious Stimulus. *Animals* **2023**, *13*, 2710. [[CrossRef](#)]
23. Kollmansperger, S.; Anders, M.; Werner, J.; Saller, A.M.; Weiss, L.; Süß, S.C.; Reiser, J.; Schneider, G.; Schusser, B.; Baumgartner, C.; et al. Nociception in Chicken Embryos, Part II: Embryonal Development of Electroencephalic Neuronal Activity *In Ovo* as a Prerequisite for Nociception. *Animals* **2023**, *13*, 2839. [[CrossRef](#)]
24. Spurlin, J., III; Lwigale, P. A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for in ovo manipulations. *Dev. Dyn.* **2013**, *242*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Itoh, Y.; Suzuki, M.; Ogawa, A.; Munechika, I.; Murata, K.; Mizuno, S. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J. Hered.* **2001**, *92*, 315–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Insafutdinov, E.; Pishchulin, L.; Andres, B.; Andriluka, M.; Schiele, B. DeeperCut: A deeper, stronger, and faster multi-person pose estimation model. In Proceedings of the ECCV (European Conference on Computer Vision), Amsterdam, The Netherlands, 11–14 October 2016. [[CrossRef](#)]
27. He, K.; Zhang, X.; Ren, S.; Sun, J. Deep residual learning for image recognition. In Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, Las Vegas, NV, USA, 27–30 June 2016. [[CrossRef](#)]
28. Mathis, M.W.; Mathis, A. Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2020**, *60*, 1–11. [[CrossRef](#)]
29. von Ziegler, L.; Sturman, O.; Bohacek, J. Big behavior: Challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling. *Neuropsychopharmacology* **2021**, *46*, 33–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hardin, A.; Schlupp, I. Using machine learning and DeepLabCut in animal behavior. *Acta Ethol.* **2022**, *25*, 125–133. [[CrossRef](#)]
31. Henke, J.; Tacke, S.; Erhardt, W. Analgesie. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, 2nd ed.; Erhardt, W., Baumgartner, C., Haberstroh, J., Eds.; Schattauer GmbH: Stuttgart, Germany, 2012; pp. 383–431.
32. Kuenzel, W.J. Neurobiological basis of sensory perception: Welfare implications of beak trimming. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 1273–1282. [[CrossRef](#)]
33. Chumak, V.I. Dinamika reflektomykh reaktzii 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 Nerovoi Sistemy Cheloveka i Zhivotnykhli v Ontogeneze*; Sbornik: Moscow, Russia, 1961; pp. 63–68.
34. Antognini, J.F.; Carstens, E. In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br. J. Anaesth.* **2002**, *89*, 156–166. [[CrossRef](#)]
35. Diener, M.; Gerstberger, R. Zentrales Nervensystem. In *Physiologie der Haustiere*, 5th ed.; von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G., Eds.; Enke: Stuttgart, Germany, 2015; pp. 131–145.
36. Willis, W.D.; Westlund, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol.* **1997**, *14*, 2–31. [[CrossRef](#)]
37. Diesch, T.J.; Mellor, D.J.; Johnson, C.B.; Lentle, R.G. Responsiveness to painful stimuli in anaesthetised newborn and young animals of varying neurological maturity (wallaby joeys, rat pups and lambs). In Proceedings of the AATEX (World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences), Tokyo, Japan, 21–25 August 2007.
38. Mackie, N.; McKeegan, D.E.F. Behavioural responses of broiler chickens during low atmospheric pressure stunning. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2016**, *174*, 90–98. [[CrossRef](#)]
39. Glatz, P.C.; Murphy, L.B.; Preston, A.P. Analgesic therapy of beak-trimmed chickens. *Aust. Vet. J.* **1992**, *69*, 18. [[CrossRef](#)]
40. Hocking, P.M.; Gentle, M.J.; Bernard, R.; Dunn, L.N. Evaluation of a protocol for determining the effectiveness of pretreatment with local analgesics for reducing experimentally induced articular pain in domestic fowl. *Res. Vet. Sci.* **1997**, *63*, 263–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Paul-Murphy, J.; Ludders, J.W. Avian analgesia. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* **2001**, *4*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Figueiredo, J.P.; Cruz, M.L.; Mendes, G.M.; Marucio, R.L.; Riccò, C.H.; Campagnol, D. Assessment of brachial plexus blockade in chickens by an axillary approach. *Vet. Anaesth. Analg.* **2008**, *35*, 511–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Binshtok, A.M.; Bean, B.P.; Woolf, C.J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* **2007**, *449*, 607–610. [[CrossRef](#)]
45. Provine, R.R.; Sharma, S.; Sandel, T.; Hamburger, V. Electrical activity in the spinal cord of the chick embryo, in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *65*, 508–515. [[CrossRef](#)]
46. Provine, R.R. Development of between-limb movement synchronization in the chick embryo. *Dev. Psychobiol.* **1980**, *13*, 151–163. [[CrossRef](#)]

47. Sharma, S.; Provine, R.R.; Hamburger, V.; Sandel, T. Unit activity in the isolated spinal cord of chick embryo, in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 40–47. [[CrossRef](#)]
48. Bekoff, A. Ontogeny of leg motor output in the chick embryo: A neural analysis. *Brain Res.* **1976**, *106*, 271–291. [[CrossRef](#)]
49. Bradley, N.S.; Solanki, D.; Zhao, D. Limb movements during embryonic development in the chick: Evidence for a continuum in limb motor control antecedent to locomotion. *J. Neurophysiol.* **2005**, *94*, 4401–4411. [[CrossRef](#)]
50. Wu, K.-C.; Streicher, J.; Lee, M.; Hall, B.; Müller, G. Role of motility in embryonic development I: Embryo movements and amnion contractions in the chick and the influence of illumination. *J. Exp. Zool.* **2001**, *291*, 186–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 8. Erweiterte Studienergebnisse

### 8.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Bewegungen

Um geschlechtsspezifische Unterschiede zu ermitteln, wurden die Reaktionen von weiblichen und männlichen Hühnerembryonen auf einen Stimulus verglichen. Folgende Parameter wurden untersucht:

- *Beak Distance* (ED13 - ED18)
- *Eye Corner Movement* (ED9, ED12 - ED18)
- *Elbow Movement* (ED9, ED12 - ED18)
- *Metatarsus Movement* (ED12 - ED18) bzw. *Tarsus Movement* (ED9)

Abbildung 8.1 visualisiert die geschlechtsspezifischen Unterschiede in Form einer Heatmap, die die entsprechenden Parameter und Zeitintervalle darstellt. Insgesamt wurden 300 Zeitintervalle vor und nach Stimulus ausgewertet. In 35 davon wurden signifikante Unterschiede in den Bewegungen von weiblichen und männlichen Hühnerembryonen gefunden. In 27 Fällen zeigten die weiblichen Tiere mehr Bewegung. ***Beak Distance***: Wie bereits in der Veröffentlichung beschrieben, wurden für ED9 und ED12 keine Daten für *Beak Distance* ausgewertet, da der noxische Reiz die Position des Schnabels veränderte und somit die Daten beeinflusste. Für *Beak Distance* konnte nur an ED15 ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion der Embryonen nachgewiesen werden. Im Intervall 0 - 30 Sekunden nach *Pinch* wiesen die männlichen Tiere eine vermehrte oder häufigere Schnabelöffnung auf. In den *Baselines* und weiteren *post stimulus* Intervallen an ED15 wurden keine Unterschiede festgestellt. Auch an den anderen untersuchten Bruttagen wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gefunden.

***Eye Corner Movement***: Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Reaktion auf einen Stimulus für diesen Parameter wurden an ED9, ED14, ED15, ED16 und

8. ERWEITERTE STUDIENERGEBNISSE

	ED9	ED12	ED13	ED14	ED15	ED16	ED17	ED18	
<b>Anzahl</b>									
n = m/w	5/5	3/7	5/5	9/7	7/9	7/8	7/9	7/9	
<b>Intervall</b>									
<b>Beak Distance</b>									
Pinch	BL		0.6302	0.5739	0.5310	0.5165	0.6500	0.7728	
	0-30		0.7803	0.2305	0.0048	0.6732	0.5928	0.2718	
	30-60		0.6452	0.3057	0.1148	0.3913	0.2360	0.5666	
	60-90		0.6310	0.2442	0.1601	0.8523	0.3537	0.7122	
	90-120		0.6273	0.2694	0.1444	0.3255	0.8387	0.6313	
Touch	BL		0.9095	0.3879	0.3432	0.3186	0.5431	0.6305	
	0-30		0.4823	0.3632	0.3402	0.4365	0.6525	0.4315	
	30-60		0.5587	0.4614	0.5115	0.1894	0.4804	0.2326	
	60-90		0.5639	0.4712	0.5020	0.2391	0.5175	0.2468	
	90-120		0.5650	0.5135	0.4696	0.3501	0.4132	0.1760	
<b>Eye Corner Movement</b>									
Pinch	BL	0.0519	0.2952	0.4825	0.1321	0.0211	0.3296	0.5274	0.2787
	0-30	0.0593	0.3886	0.7146	0.0025	0.0011	0.0498	0.6992	0.0042
	30-60	0.1278	0.3140	0.0884	0.6431	0.2476	0.8246	0.5593	0.9250
	60-90	0.1889	0.5142	0.2206	0.3639	0.1862	0.3402	0.6075	0.4868
	90-120	0.0675	0.4536	0.5302	0.0838	0.0662	0.1528	0.2715	0.7924
Touch	BL	0.0302	0.3862	0.4203	0.4473	0.0025	0.5168	0.3201	0.1069
	0-30	0.0039	0.2711	0.5580	0.0049	0.0157	0.2117	0.5011	0.0392
	30-60	0.0296	0.4465	0.4951	0.0106	0.0909	0.4650	0.2380	0.3502
	60-90	0.0046	0.9221	0.8868	0.1516	0.0439	0.3518	0.7797	0.0367
	90-120	0.1637	0.6809	0.6725	0.0648	0.0443	0.4471	0.7104	0.1757
<b>Elbow Movement</b>									
Pinch	BL	0.9280	0.0707	0.8856	0.0565	0.1115	0.9531	0.0824	0.7605
	0-30	0.1228	0.3510	0.5450	0.0693	0.0053	0.6023	0.2714	0.7550
	30-60	0.6154	0.0469	0.8800	0.1245	0.3813	0.8204	0.4380	0.9472
	60-90	0.7269	0.0179	0.6532	0.1144	0.3096	0.1034	0.5229	0.7469
	90-120	0.8452	0.0326	0.8463	0.0096	0.0383	0.1510	0.6867	0.7733
Touch	BL	0.3382	0.0585	0.8362	0.2476	0.0221	0.2454	0.0730	0.5706
	0-30	0.0001	0.0361	0.3568	0.1269	0.0059	0.0535	0.1236	0.3717
	30-60	0.8138	0.2357	0.1351	0.0042	0.0588	0.0614	0.1014	0.3336
	60-90	0.0700	0.3846	0.5065	0.0706	0.0119	0.3548	0.2051	0.4586
	90-120	0.0945	0.1059	0.8663	0.0145	0.4622	0.1044	0.2305	0.8343
<b>Metatarsus (ED9 Tarsus) Movement</b>									
Pinch	BL	0.6657	0.2423	0.5546	0.1134	0.5340	0.8981	0.0721	0.4058
	0-30	0.0062	0.3302	0.0998	0.0695	0.0014	0.9443	0.0727	0.0504
	30-60	0.4657	0.5035	0.4551	0.1900	0.5701	0.8352	0.1180	0.6719
	60-90	0.2822	0.1854	0.4210	0.0932	0.8085	0.2240	0.3584	0.2350
	90-120	0.1915	0.1102	0.3250	0.0207	0.7855	0.3800	0.9276	0.6748
Touch	BL	0.2803	0.5378	0.1508	0.1460	0.0754	0.5723	0.5445	0.7374
	0-30	0.2122	0.2009	0.1103	0.0540	0.0629	0.3175	0.0153	0.0907
	30-60	0.6531	0.5167	0.1386	0.1809	0.0755	0.4200	0.1656	0.1349
	60-90	0.2107	0.4946	0.3748	0.4432	0.2251	0.5486	0.4567	0.3314
	90-120	0.1415	0.7069	0.2870	0.0891	0.4007	0.2675	0.5992	0.2967

Abbildung 8.1: Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Parametern *Beak Distance*, *Eye Corner Movement*, *Elbow Movement* und *Metatarsus Movement* bzw. *Tarsus Movement* (ED9). Angabe der Anzahl männlicher (m) und weiblicher (w) Embryonen je Versuchsgruppe. Statistische Auswertung mittels robuster linearer gemischter Modelle für alle Analysen. Unterschiede zwischen bestimmten Gruppen wurden nach Modellanpassung anhand der geschätzten marginalen Mittel mit der Tukey-Korrektur des p-Werts für multiple Vergleiche bewertet. Ergebnisse mit  $p\text{-Wert} \leq 0,05$  galten als statistisch signifikant. Angabe der p-Werte. Grau: keine signifikanten Unterschiede. Blau: signifikanter Unterschied, männliche Embryonen zeigten vermehrte Bewegungen. Rot: signifikanter Unterschied, weibliche Embryonen zeigten vermehrte Bewegungen.

ED18 gefunden. Eine signifikant stärkere Bewegung des Kopfes auf einen Stimulus zeigten weibliche Embryonen an ED14 und ED15 im jeweiligen Zeitintervall 0 - 30 Sekunden nach *Touch* und *Pinch*. An ED15 wurden auch in der jeweiligen *Baseline* vor Stimulus stärkere Bewegungen weiblicher Embryonen festgestellt. An ED16 und ED18 zeigten im Intervall 0 - 30 Sekunden nach *Pinch*, die männlichen Embryonen mehr Aktivität, für ED18 nach *Touch* die weiblichen Embryonen. Zusätzlich zeigten männliche Embryonen an ED9 in der *Baseline* vor *Touch*, sowie den drei Zeitintervallen danach mehr Bewegungen des Kopfes als die weiblichen Embryonen.

***Elbow Movement:*** Nur an ED9, im Intervall 0 - 30 Sekunden nach *Touch* zeigten männliche Embryonen mehr Bewegungen des Ellbogens. Ansonsten waren in verschiedenen Intervallen sowohl nach *Pinch* als auch nach *Touch* die Ellbogenbewegungen der weiblichen Tiere verglichen zu den männlichen vermehrt. Nur an ED15 wurden auch in der *Baseline* vor dem *Touch* vermehrt Ellbogenbewegungen weiblicher Tiere festgestellt. An den Bruttage ab ED16 gab es keine Unterschiede in der Reaktion von weiblichen und männlichen Hühnerembryonen auf einen Stimulus.

***Metatarsus (ED 9 Tarsus) Movement:*** In vier Intervallen zeigten weibliche Embryonen signifikant mehr Bewegungen des Metatarsus respektive des Tarsus (ED9) als die männlichen. Dies betraf ED9 und ED15 je im Intervall 0 - 30 Sekunden nach *Pinch* und ED14 im Intervall 90 - 120 Sekunden nach *Pinch*. An ED17 war das Intervall 0 - 30 Sekunden nach *Touch* betroffen.

## 8.2 Vergleich zwischen Beobachtern

Um mögliche Einflüsse auf die in der Veröffentlichung beschriebenen Ergebnisse durch eine subjektive Beurteilung von Observer 1 (2023) zu erkennen wurden die Videoaufnahmen der ED18 Embryonen ein Jahr später durch den gleichen Beobachter (Observer 1 (2024)) sowie durch einen zweiten Beobachter (Observer 2) mit vergleichbarer Expertise nocheinmal ausgewertet. In Tabelle 8.1 sind die Ergebnisse der insgesamt drei Auswertungen der Beobachter dargestellt.

Eine grafische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Anhang 15.2 (Abbildung 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5). Zusätzlich zeigt Tabelle 15.1 im Anhang für jede Auswertung durch einen Beobachter die absolute Anzahl an Embryonen einer Versuchsgruppe, die eine definierte Verhaltensweise innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls mindestens einmal gezeigt haben.

## 8. ERWEITERTE STUDIENERGEBNISSE

Tabelle 8.1: Gegenüberstellung der Auswertungen embryonaler Verhaltensweisen durch verschiedene Beobachter. Prozentualer Anteil an Embryonen einer Versuchsgruppe, die eine definierte Verhaltensweise innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls mindestens einmal gezeigt haben.

		Observer 1 (2023)		Observer 1 (2024)		Observer 2 (2024)	
		%		%		%	
		<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>
<b>Beak Shift</b>	<i>Baseline</i>	6,3	25	12,5	25	25	31,3
	<i>0-30 s post stim.</i>	6,3	31,3	18,8	18,8	31,3	56,3
<b>Mandibulation</b>	<i>Baseline</i>	37,5	31,3	50	50	25	31,3
	<i>0-30 s post stim.</i>	87,5	68,8	81,3	68,8	50	37,5
<b>Beak Opening</b>	<i>Baseline</i>	0	0	6,3	0	6,3,0	0
	<i>0-30 s post stim.</i>	62,5	18,8	56,3	12,5	56,3	31,3
<b>Wide Beak Opening</b>	<i>Baseline</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>0-30 s post stim.</i>	87,5	0	87,5	0	87,5	0

Deutliche Unterschiede zwischen den Auswertungen der Beobachter fanden sich vor allem für *Beak Shift* und die *Mandibulation*. *Beak Shift* wurde von Observer 2 in jedem Intervall häufiger beobachtet als von Observer 1. Gemeinsam ist allen drei Auswertungen, dass diese Bewegung nach *Touch* häufiger beobachtet wurde als in der *Baseline* oder nach *Pinch*.

Für die *Mandibulation* zeigten alle Auswertungen ein ähnliches Muster: am häufigsten wurde diese Bewegung nach *Pinch*, am seltensten in der *Baseline* beobachtet. Insgesamt hat Observer 2 die *Mandibulation* jedoch in jedem Intervall weniger beobachtet als Observer 1, was invers zum Resultat für *Beak Shift* ist.

In einer kombinierten Auswertung, bei der das *Beak Shift* und die *Mandibulation* als gleiche Bewegung betrachtet wurden, näherten sich die Ergebnisse aller drei Auswertungen an (Tabelle 8.2). Deutlichster Unterschied blieb nach *Pinch* zwischen Observer 1 (87,5 %, 2023 und 2024) und Observer 2 (62,5 %).

Tabelle 8.2: *Beak Shift* und/oder *Mandibulation* im Vergleich verschiedener Beobachter. Prozentualer Anteil an Embryonen einer Versuchsgruppe, die *Beak Shift* und/oder *Mandibulation* innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls mindestens einmal gezeigt haben.

		Observer 1 (2023)		Observer 1 (2024)		Observer 2 (2024)	
		%		%		%	
		<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>	<i>Pinch</i>	<i>Touch</i>
<b>Beak Shift</b>	<i>Baseline</i>	43,8	50	50	56,3	50	50
<b>+ Mandibulation</b>	<i>0-30 s post stim.</i>	87,5	75	87,5	75	62,5	75

Auch im *Beak Opening* ist für alle drei Auswertungen ein gleichbleibendes Muster zu sehen. Am häufigsten wurde es nach *Pinch* beobachtet, am wenigsten bis gar nicht in der *Baseline*. In allen drei Auswertungen zeigten 87,5 % der Tiere das *Wide Beak Opening* nach *Pinch*. Nach *Touch* oder in einer *Baseline* wurde dieses spezifische Verhalten nie beobachtet.

## 8. ERWEITERTE STUDIENERGEBNISSE

Cohen's Kappa wurde sowohl für die leOR als auch die laOR berechnet. Tabelle 8.3 zeigt die Ergebnisse übergreifend für alle Bewegungen und Zeitintervalle. In Tabelle 8.4 werden die Ergebnisse für die jeweilige Bewegung über den gesamten Beobachtungszeitraum aufgezeigt.

Tabelle 8.3: Gesamtwerte für Cohen's Kappa. Angabe von Cohen's Kappa für die Intra-observer-reliability, sowie die jeweilige Inter-observer-reliability. Die Berechnung erfolgte übergreifend für alle Bewegungen und über alle Zeitintervalle hinweg.

Cohens' Kappa	Intra-observer-reliability	Inter-observer-reliability	Inter-observer-reliability
	<i>Observer 1 (2023) &amp; Observer 1 (2024)</i>	<i>Observer 1 (2023) &amp; Observer 2</i>	<i>Observer 1 (2024) &amp; Observer 2</i>
<b>Gesamt</b>	0,81	0,64	0,66

Tabelle 8.4: Verhaltensindividuelle Werte für Cohen's Kappa. Angabe von Cohen's Kappa für die Intra-observer-reliability, sowie die jeweilige Inter-observer-reliability. Die Berechnung erfolgte für jede Bewegung separat, jedoch über alle Zeitintervalle hinweg

Cohen's Kappa	Intra-observer-reliability	Inter-observer-reliability	Inter-observer-reliability
	<i>Observer 1 (2023) &amp; Observer 1 (2024)</i>	<i>Observer 1 (2023) &amp; Observer 2</i>	<i>Observer 1 (2024) &amp; Observer 2</i>
<b>Beak Shift</b>	0,51	0,41	0,67
<b>Mandibulation</b>	0,96	0,55	0,56
<b>Beak Opening</b>	0,81	0,63	0,63
<b>Wide Beak Opening</b>	1,00	0,91	0,91



## 9. Erweiterte Diskussion

### 9.1 Einflussfaktoren auf das Verhalten in der *Baseline*

In der veröffentlichten Studie sah das Studiendesign vor, dass das Zeitintervall vor Stimulation als Basalwert, *Baseline*, genutzt wurde [7]. Es wurde dabei angenommen, dass die Bewegungen und die Aktivität der Hühnerembryonen vor dem Stimulus dem natürlichen Verhalten der Embryonen entsprechen. Natürliches Verhalten ist dasjenige, das Tiere in ihrer gewohnten Umgebung ohne störende oder bedrohliche Faktoren zeigen [110]. Insbesondere Vögel sind dafür bekannt, ihr Verhalten unter Stress zu verändern [118, 123]. Die Messungen der *Baselines* konnten dem Studiendesign geschuldet nicht vollständig ohne Einwirkung von außen zustande kommen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Aktivität in der Zeit der *Baseline* ebenfalls durch den Stress der Vorbereitungen gewissen Einflüssen unterlag. Die Öffnung der Eischale, die vorbereitende Präparation unter Eröffnung der CAM und die Beobachtung unter einer Lichtquelle stellten Stressfaktoren dar, die nicht eliminiert werden konnten. Für eine konkrete Differenzierung der Bewegungen des Embryos war jedoch der direkte Blick unerlässlich. Die Analyse der Bewegungen bei geschlossener Schale mithilfe von Sensoren, die lediglich die allgemeine Bewegungsintensität messen und keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Körperregionen wie Flügeln und Kopf ermöglichen, erfüllte die Anforderungen dieser Studie nicht [201, 202].

Während der Erstellung des Studiendesigns lag der Fokus darauf, die Einflussfaktoren bestmöglich zu reduzieren, ohne die Anforderungen an die Zugänglichkeit und Sichtbarkeit des Embryos zu vernachlässigen. Nach der Prüfung verschiedener Eissysteme erwies sich die Fenestrierung als die geeignetste und schonendste Methode. Dieses *in ovo* System ermöglicht es dem Embryo, während des gesamten Entwicklungszeitraums in der eigenen Schale zu verbleiben, was den natürlichen Bedingungen am besten gerecht wird [32]. Zudem erfolgte die initiale Öffnung des Eis bereits an ED3 [32]. Diese Stresssituation fand somit mindestens 6 Tage vor

Beginn der Versuche an ED9 statt.

Die Fenestrierung der Eier bedeutet auch, dass die Embryonen einer höheren Lichtexposition ausgesetzt waren, als im geschlossenen Ei. Es ist bekannt, dass Licht einen Einfluss auf die Motilität von Hühnerembryonen haben kann [165, 203]. Wu et al. beobachteten Embryonen von ED4 bis ED14, welche in vergleichbarer Weise gefenstert wurden [165]. Die Lichtintensität wurde von  $1\text{mW}/\text{cm}^2$  auf  $12\text{mW}/\text{cm}^2$  erhöht und den Embryonen eine zweistündige Gewöhnungszeit gewährt bevor die Beobachtungsphasen begannen [165]. Unter erhöhten Lichtintensitäten kam es zu einer Steigerung der Anzahl an beobachteten Bewegungen um im Schnitt 220% [165]. Die frühe Eröffnung des Eis an ED3 bot den Embryonen die Möglichkeit, sich über mindestens 6 Tage hinweg an eine verstärkte Lichtexposition zu gewöhnen. Somit sollte der Einfluss einer erhöhten Lichtintensität während der Experimente so gering wie möglich gehalten werden.

Die Eröffnung der CAM am Versuchstag sowie jegliche weitere Manipulation erfolgte stets unter größtmöglicher Umsicht, um mögliche Einflüsse durch Stress gering zu halten.

Zusätzlich wurden die Umgebungstemperatur und Luftfeuchte sowie die Eitemperatur während der Versuche überwacht um weitgehend den regulären Inkubationsbedingungen von Hühnerembryonen zu entsprechen. Studien weisen darauf hin, dass die Temperatur im Eiinneren bzw. des Embryos Auswirkungen auf die Motilität haben könnte [204, 205]. Die Datenlage, wenn auch beschränkt, deutet darauf hin, dass Bewegungen von vor allem Embryonen fortgeschrittener Entwicklungsstadien (ED15, ED20) verlangsamt oder verringert sein können, wenn die Embryonen deutlich geringeren Temperaturen ( $30,5^\circ\text{C}$ ) als ihrer regulären Inkubationstemperatur ( $37,5^\circ\text{C}$ ) ausgesetzt sind [204]. In jüngeren Entwicklungsstadien bis ED12 scheinen die Einflüsse geringer zu sein [204].

Die Auswertung der Bewegungen in den *Baselines* mittels DLC zeigte innerhalb eines Bruttages weitgehend konstante Werte [7]. Auch geschlechtsspezifische Differenzen in den *Baselines* traten nur vereinzelt auf. Diese Konstanz stützt die Annahme, dass in der *Baseline* das Normverhalten weitgehend repräsentiert wurde. Es bleibt jedoch offen, in welchem Ausmaß weitere externe Einflüsse möglicherweise dennoch Auswirkungen hatten.

## 9.2 Parameter für Nozizeption und Schmerz beim Hühnerembryo

Es gilt als komplex, valide Schmerzparameter für Embryonen zu finden [94]. Für menschliche Feten wurden inzwischen diverse Studien durchgeführt, die sowohl physiologische als auch Bewegungsparameter untersuchen [206–209]. Ab der Hälfte der Schwangerschaft zeigen menschliche Feten auf potenziell schmerz- oder stressverursachende Reize Reaktionen wie Bewegungen des Körpers und Veränderungen der Mimik [206, 208, 209]. 2018 regten Forscher an, das „Neonatal Facial Scoring System“, das zur Erkennung von Schmerz und Leiden bei Neugeborenen (einschließlich Frühgeborenen) validiert ist, auch bei Feten zu verwenden [210, 211]. Durch Echtzeit-3D-Scans sollte die Mimik von Feten während intrauterinen Operationen überwacht werden [211].

Es gibt nur wenig Literatur, die mögliche Schmerzparameter bei Hühnerembryonen untersucht. Horr et al. setzten Bewegungen bzw. deren Reduktion als Indikator für eine wirksame Anästhesie und Analgesie bei Applikation eines thermischen Reizes ein, jedoch wurden die Bewegungen allgemein erfasst, ohne eine Differenzierung nach Körperteilen vorzunehmen [202]. Chumak beschäftigte sich, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, als einer der wenigen spezifischer mit einem Zusammenhang von potenziell schmerzhaften Reizen und Bewegungen als Reaktion darauf [169]. Jedoch sind die Bewegungen häufig nur unzureichend genau beschrieben [169]. Dennoch bietet diese Veröffentlichung wesentliche Informationen, insbesondere hinsichtlich der sich entwickelnden Sensitivität unterschiedlicher Bereiche des embryonalen Körpers. Relevant ist hierbei v.a., dass mit die frühesten Reaktionen durch Reize im Bereich des Schnabels hervorgerufen werden können [169].

Eine Übertragung von schmerzassoziierten Bewegungen und Verhaltensweisen von adulten Hühnervögeln auf Hühnerembryonen erwies sich als schwierig. Viele in Studien genutzte Parameter beziehen sich auf Veränderungen von natürlichen Verhaltensweisen wie beispielsweise eine verminderte Futterraufnahme oder erhöhte Ruhephasen [132–153]. Solche Verhaltensweisen sind beim Embryo noch nicht ausgeprägt. Ausgehend vom schmerzassoziierten Verhalten adulten Hühner kann bezüglich möglicher Parameter beim Embryo höchstens auf Veränderungen bzgl. Aktivität und Inaktivität geschlossen werden, jedoch bieten sich nur wenige Hinweise auf konkrete Bewegungen.

Es sollte berücksichtigt werden, dass die Vielzahl an Veröffentlichungen zu schmerzassoziiertem Verhalten bei Hühnervögeln hauptsächlich auf ihrem Status als Nutztier beruht (siehe Kapitel 5.1.2) [113, 119]. Häufig werden Studien in Herden

durchgeführt, und das Verhalten wird meist im Kontext der gesamten Gruppe betrachtet [132–153]. Es ist möglich, dass das Verweilen in der Herde das Verhalten der Tiere beeinflusst [112, 118]. Auch Leistungsparameter wurden v.a. in älteren Publikationen zur Beurteilung herangezogen [140, 141, 143, 147–150, 152, 153]. Die Informationen über das Verhalten einzelner Tiere außerhalb der Herde, vergleichbar mit Haustieren wie Ziervögeln, sind erheblich begrenzter.

Die Daten weisen jedoch darauf hin, dass eine Beziehung zwischen der Stelle des potenziell schmerzhaften Reizes und verschiedenen beobachteten Reaktionen existiert. Nach dem Kürzen des Schnabels traten Veränderungen auf, die mit der potenziell schmerzhaften Region in Zusammenhang stehen, darunter ein verändertes Pickverhalten [132–135, 137–140, 142, 144–147, 151]. Bei einem mechanischen Reiz durch eine buccale Injektion wurden Reaktionen im Bereich der Augen (geschlossene Lider) beobachtet [155]. Bei einem potenziell noxischem Reiz an Brustbein und Bein wurde die Reizursache bepickt [154]. Daher wurde für die vorliegende Untersuchung die Erwartung formuliert, dass ein potenziell noxischer Reiz auch in der direkten Umgebung der Applikation Reaktionen hervorrufen könnte.

Basierend auf all diesen Überlegungen konnte zum Start der vorliegenden Untersuchung nicht auf bereits bestehende Literatur bezüglich gesicherter schmerzassoziierter Bewegungen und Verhaltensweisen für Hühnerembryonen zurückgegriffen werden. Die Untersuchung konzentrierte sich daher zunächst auf die umfassende Überwachung der Bewegungen sämtlicher regelmäßig sichtbarer Körperteile. Die manuellen Beobachtungen und die Sammlung qualitativer, deskriptiver Daten führten zur Entwicklung eines präziseren Überwachungsschemas, das durch technische Hilfsmittel umgesetzt werden konnte. Dazu wurden repräsentative Punkte an Schnabel, Kopf, Flügel und Bein gewählt.

Im Rahmen von Vorstudien konnten als Reaktion auf einen noxischen mechanischen Reiz an der Schnabelbasis vermehrte Schnabelbewegungen (Schnabelöffnungen) identifiziert werden. Dies entsprach beschriebenen Erwartungen, dass ein Reiz auch eine Reaktion an der entsprechenden Lokalisation hervorrufen könnte. Somit konnte der Fokus der Auswertungen auf die Schnabelbewegungen gesetzt werden. Schnabelbewegungen wurden auch als Teil des physiologischen Verhaltens von Hühnerembryonen beschrieben [160, 203]. Hamburger und Oppenheim beschreiben das „Beak clapping“ als eine schnelle und kleine Öffnung des Schnabels welche wiederkehrend über den gesamten Zeitraum der Entwicklung stattfindet [160]. Eine ähnliche Bewegung, die in der Beschreibung erwähnt wird, wurde von Mackie und McKeegan bei adulten Hühnervögeln festgestellt, die einem Verfahren zur Betäubung durch niedrigen Luftdruck („low atmospheric pressure

stunning“) vor der Schlachtung unterzogen wurden [168]. Die Autoren bezeichnen die Bewegung als *Mandibulation* [168]. Hamburger und Oppenheim betrachteten dies als eine im natürlichen Verhalten vorkommende Bewegung. [160]. Mackie und McKeegan interpretierten diese Bewegung als einen Ausdruck von Stress [168]. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde diese Bewegung beobachtet, ebenfalls als *Mandibulation* bezeichnet. Die *Mandibulation* wurde stets in den *Baselines* und nach beiden Stimuli (*Touch*, *Pinch*) beobachtet, was den Beobachtungen von Hamburger und Oppenheim entspricht, dass dies eine beständig vorkommende Bewegung ist [7, 160]. Angesichts der Interpretation von Mackie und McKeegan könnte jedoch der Standpunkt vertreten werden, dass das gesamte Setup und der Studienaufbau, trotz aller Maßnahmen, einer Stresssituation entsprechen. Das fortwährende Auftreten der *Mandibulation* könnte somit auch hier als Stressreaktion interpretiert werden. Auch der Studienaufbau von Hamburger und Oppenheim in den 1960er Jahren umfasste die Öffnung des Eies, in diesem Fall direkt am Tag der Untersuchung [160]. Somit stellt dieses Studiendesign ebenfalls eine Stresssituation für den Hühnerembryo dar [160]. Damit könnte das „Beak Clapping“ / die *Mandibulation* auch bereits hier ein Ausdruck für Stress gewesen sein.

Von Bedeutung ist, dass stressassoziierte Bewegungen und Verhaltensweisen nicht fälschlicherweise als schmerzassoziiert interpretiert werden. Sowohl das *Wide Beak Opening* als auch das *Beak Opening* konnten mit hoher Spezifität als Reaktionen auf den noxischen Reiz identifiziert werden. Beide Bewegungen entsprachen keiner Beschreibung in der verfügbaren Literatur und wurden auch nicht regelmäßig nach dem Kontrollreiz oder in einer Baseline beobachtet. Die softwaregestützte Auswertung konnte zudem bestätigen, dass die Schnabelöffnung nach einem noxischen Reiz erhöht war. Die Assoziation dieser Bewegungen bzw. allgemein vermehrter Schnabelöffnungen mit dem noxischen Reiz an der Schnabelbasis erscheint daher gerechtfertigt und die Bewegungen könnten als Hinweis auf eine funktionierende Nozizeption dienen.

Zu den wenigen im Bereich der Mimik beschriebenen Reaktionen bei Vögeln zählen Veränderungen im Augenbereich, beispielsweise das Schließen oder Zusammenknäpfen der Lider [52, 154]. Daher wurde in den Vorstudien auch besonders auf diesen Bereich geachtet, wobei mittels DLC verschiedene Punkte im Bereich des Auges (Augenwinkel, Augenrand, Lid) verfolgt wurden, um potenzielle Reaktionen auf den noxischen Reiz zu erkennen. Es konnten jedoch keine derartigen Bewegungen identifiziert werden. Stattdessen stellte der Augenwinkel eine für DLC sicher zu identifizierende Körperstelle dar und diente daher als repräsentativer Punkt zur Überwachung von Kopfbewegungen. In einer Studie mit adulten Hühnern, bei der

ein mechanischer Reiz durch eine buccale Injektion gesetzt wurde, konnten Veränderungen der Kopfbewegungen und -haltung beobachtet werden [154]. Auch nach dem Schnabelkürzen wurden Veränderungen der Kopfbewegungen beobachtet [138, 143, 145]. Es erschien plausibel anzunehmen, dass ein noxischer Reiz am Schnabel ebenfalls Veränderungen im Bereich des Kopfes bewirken könnte. Die Ergebnisse der softwaregestützten Auswertung zeigen, dass ab ED16 tatsächlich vermehrte Kopfbewegungen nach dem noxischen Reiz festgestellt wurden. Es ist zu berücksichtigen, dass diese Kopfbewegungen nicht durch die Manipulation am Schnabel bei der Applikation des mechanischen Reizes hervorgerufen wurden. Es wurde sichergestellt, dass die Bewegungsanalyse erst nach der Beendigung der Manipulation am Embryo einsetzte. Es muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ein Zusammenhang zwischen Schnabel- und Kopfbewegungen besteht, wodurch die ausgeprägten Bewegungen der Schnabelöffnung ab ED16 möglicherweise einen Einfluss auf die vermehrten Kopfbewegungen haben könnten.

Insgesamt erwies sich die Auswahl an Parametern, die als schmerzassoziiert gelten könnten oder als Parameter für Nozizeption herangezogen werden konnten, als begrenzt; zudem waren die Hinweise aus der Literatur oft vage oder nur schwer zu übertragen. Im Entwicklungsprozess der Studie, welcher verschiedene Vorstudien einschloss, konnten die vermehrten Schnabelöffnungen als Reaktion auf den noxischen Reiz identifiziert werden, die damit wiederum auf eine funktionierende Nozizeption hindeuten. Es ist zu bedenken, dass nicht abschließend geklärt werden konnte, ab wann ein Hühnerembryo grundsätzlich in der Lage ist, Bewegungen wie das *Wide Beak Opening* auszuführen. Die vorliegende Untersuchung zeigt jedoch, dass das *Beak Opening* bereits ab ED9, dem frühesten untersuchten Bruttag, vereinzelt bei Embryonen beobachtet wurde, was zeigt, dass eine Schnabelöffnung mindestens ab diesem Zeitpunkt grundsätzlich möglich ist. Auch Chumak beschreibt ab dem 9. bis 10. Inkubationstag Schnabelöffnungen als Teil der spontanen embryonalen Bewegungen [169]. Obwohl unklar bleibt, ob die Bewegung aufgrund der ungenügenden Beschreibung einem *Beak Opening* ähnelt, zeigt dies doch die Fähigkeit der Hühnerembryonen zur Schnabelöffnung in diesem frühen Entwicklungsstadium.

### 9.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Studien haben nachgewiesen, dass es im Menschen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung gibt [212]. Die genaue Erfassung dieser Unterschiede ist Gegenstand aktueller Forschung, insbesondere da dieser Aspekt lange Zeit vernachlässigt wurde und viele Studien zur Nozizeption auf männlichen Nagetieren basierten [213]. Es ist jedoch mittlerweile erwiesen, dass diese geschlechtsspezifischen Unterschiede bereits vor der bewussten Wahrnehmung und Interpretation im Gehirn als Schmerz auftreten können [213].

Es wurden u.a. potenzielle Unterschiede in den Schwellenwerten von Nozizeptoren zwischen weiblichen und männlichen Tieren an Mäusen erforscht [214]. Dabei wurde festgestellt, dass die Mechanozeptoren der Haut und Muskulatur bei weiblichen Mäusen einen geringeren Schwellenwert aufweisen [214]. Träfe dies auch für Hühnerembryonen zu, so könnte dies die hier beobachtete vermehrte Aktivität weiblicher Embryonen vor allem an ED14 und ED15 erklären. Nozizeptoren, die mechanische, thermische und chemische Reize verarbeiten, sind im Huhn nachgewiesen worden [60]. Außerdem sind auch artspezifische Besonderheiten bekannt [60]. Daten zu geschlechtsspezifischen Differenzen bei den Schwellenwerten sind jedoch bislang weder für adulte Hühner noch Hühnerembryonen verfügbar. In den Bruttagen 17 und 18 wurde eine vermehrte Aktivität weiblicher Tiere, vergleichbar zu ED14 und ED15, nicht nachgewiesen. Dies wäre durch die weiter fortgeschrittene Entwicklung zu erwarten, falls die niedrigeren Schwellenwerte von Nozizeptoren weiblicher Tiere die Ursache für die verstärkten Reaktionen wären. Auf funktioneller Ebene konnten bei Mäusen, nicht humanen Primaten und Menschen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Sensitivität der Nozizeptoren aufgrund hormoneller Einflüsse nachgewiesen werden [215]. Nozizeptoren weiblicher Tiere wurden durch den Einfluss von Prolaktin sensibilisiert [215]. Bei männlichen Tieren blieb dieser Effekt aus [215]. Für Vögel existieren bislang keine vergleichbaren Daten hierzu. Prolaktin konnte im Hühnerembryo (Geschlechter in Studie unbestimmt) ab Bruttag 9 nachgewiesen werden [216]. Messungen zeigen einen deutlichen Anstieg des Hormonspiegels nach Bruttag 13 sowie einen Peak an Bruttag 17 [216]. Ob die verstärkten Bewegungen der weiblichen Tiere an ED14 und ED15 einen Zusammenhang mit hormonellen Einflüssen haben bleibt jedoch fraglich. Zu Bedenken ist, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede in etwa der Hälfte der Fälle nach dem nicht noxischen Kontrollreiz auftraten. Auch wenn eine verstärkte Wahrnehmung des noxischen Reizes durch weibliche Nozizeptoren durchaus möglich ist, so erklärt dies nicht die verstärkten Bewegungen nach dem Kontrollreiz und teilweise auch in der *Baseline*.

Geschlechtsspezifische Unterschiede im Schmerzverhalten von Tieren wurde in früheren Studien bereits untersucht. Banik et al. untersuchten in einer Studie das Verhalten von männlichen und weiblichen DBA2 Mäusen nach einer Inzision an der Hinterpfote [217]. Dabei wurden Schutzverhalten, Druck- und Temperaturempfindlichkeit der Wunde getestet [217]. In keinem Fall konnte ein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden [217]. Für adulte Zebrafische wurden ebenfalls verschiedene Verhaltensparameter nach intraperitonealer Applikation von Essigsäure untersucht [218]. Für einige spezifische Verhaltensweisen konnten geschlechtsspezifische Unterschiede detektiert werden, z.B. zeigten weibliche Zebrafische häufiger Episoden der Bewegungslosigkeit in Folge des noxischen Reizes [218]. Größtenteils wurden jedoch keine oder nur subtile Unterschiede im Verhalten zwischen den Geschlechtern festgestellt [218]. Speziesübergreifend liegt also nahe, dass nicht zwangsläufig geschlechtsspezifische Unterschiede im Verhalten adulter Tiere vorhanden sein müssen, jedoch die Möglichkeit dazu besteht. Für die untersuchten Hühnerembryonen wurde die Öffnung des Schnabels als deutlichste Reaktion auf einen noxischen Reiz identifiziert. Es konnten jedoch nach dem noxischen Reiz keine Unterschiede in der Reaktion zwischen männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden. Stattdessen wurden die meisten Unterschiede an ED14 und ED15 im Bereich der Körperbewegungen gefunden.

Da die vermehrten Bewegungen durch die weiblichen Tiere sowohl nach noxischem Stimulus wie auch Kontrollreiz gefunden wurden, ist nicht davon auszugehen, dass hier ein direkter Zusammenhang zu einem geschlechtsspezifisch unterschiedlichem Schmerzverhalten besteht. Die Möglichkeit, dass sich die Motilität von Hühnerembryonen grundsätzlich abhängig vom Geschlecht unterscheidet wurde in einer Studie von 2021 untersucht [201]. Im Zuge der Suche nach Möglichkeiten der *in ovo* Geschlechtsbestimmung sollte eine nicht invasive, optische Methode entwickelt werden, um anhand der Körperbewegungen die Geschlechter zu unterscheiden [201]. Hierbei wurden die inkubierten Hühnereier an den Bruttagen 6 bis 19 mittels eines Nahinfrarot-Sensors untersucht [201]. Zusammengefasst ergab die Studie, dass männliche Hühnerembryonen ab etwa ED9, wenn die Produktion von Geschlechtshormonen beginnt, eine erhöhte Aktivität zeigen [201]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier zeigten weibliche Hühnerembryonen häufiger mehr Aktivität, insbesondere an den Bruttagen ED14 und ED15. Signifikant vermehrte Bewegungen durch die männlichen Embryonen waren weniger häufig und Zeitintervalle in denen ein signifikanten Unterschied bestand traten vor allem isoliert auf. Die Ausnahme bildeten Bewegungen des Flügels (*Elbow Movement*) an ED9. Hier zeigten nach *Touch* die männlichen Embryonen



vermehrt Bewegungen in den ersten 90 Sekunden nach Reiz.

Khaliduzzaman et al. beschreiben, dass gegen Ende der Inkubation, die Unterschiede zwischen den Geschlechtern schwinden [201]. Übereinstimmend damit wurden in der vorliegenden Studie ab ED16 nur noch vereinzelt geschlechtsspezifisch unterschiedliche Reaktionen auf einen Stimulus nachgewiesen. Ein relevanter Unterschied im Studiendesign ist, dass Khaliduzzaman et al. die Embryonen in Ruhe analysiert hat [201]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen beziehen sich jedoch größtenteils auf die Situation nach einem Reiz.

Bei Fokussierung auf die Intervalle der *Baseline*, welche das Normalverhalten und die reguläre Intensität an Bewegungen abbilden sollten, konnte die Beobachtung von Khaliduzzaman et al. nicht bestätigt werden. Geschlechtsspezifische Unterschiede in einer *Baseline* wurden in nur vier Fällen nachgewiesen. Betroffen waren hier vor allem Kopfbewegungen, dargestellt mittels *Eye Corner Movement*. An ED15 wurde in beiden *Baselines* vor Stimulus eine vermehrte Bewegung der weiblichen Tiere, an ED9 vor *Touch* der männlichen Tiere nachgewiesen. Unter der Annahme, dass die *Baseline* das tatsächliche Normverhalten abbildet, würde dies bedeuten, dass nur in wenigen Fällen geschlechtsspezifische Unterschiede in den Bewegungen der Hühnerembryonen nachzuweisen sind. Außerdem konnten in den auftretenden Fällen nicht eindeutig einem Geschlecht eine vermehrte Motilität zugewiesen werden, anders, als dies bei Khaliduzzaman et al. der Fall war [201]. An dieser Stelle sei jedoch auch auf Kapitel 9.1 verwiesen, bezüglich möglicher Einflüsse auf die *Baseline* dieser Studie.

Zusammenfassend lässt sich anhand der grafischen Darstellung (Abbildung 8.1) deutlich sehen, dass die Verteilung der Zeitintervalle, in denen geschlechtsspezifisch unterschiedliche Reaktionen gefunden wurden, kein regelmäßiges Muster aufweist. Zeitintervalle, in denen die Hühnerembryonen geschlechtsspezifisch signifikant mehr Bewegung zeigten, erscheinen oft vereinzelt oder unregelmäßig alternierend mit Intervallen ohne nachweisbaren Unterschied. Die Gründe für die zeitweise vermehrte Aktivität weiblicher Embryonen v.a. an ED14 und ED15 sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt. Es sollte berücksichtigt werden, dass die vorliegende Studie explorativen Charakter hatte und nur eine geringe Anzahl an Tieren umfasst. Eine konformative Untersuchung mit größeren Stichproben könnte hier zusätzliche Klarheit bringen und die Ergebnisse festigen.

## 9.4 Vergleich der Analyse: Software und Mensch

Sowohl in der manuellen Auswertung als auch in der softwaregestützten Analyse wurden vermehrte Schnabelöffnungen nach einem noxischen Reiz beobachtet. Während die Interpretationen beider Analysen übereinstimmt, sollte beachtet werden, dass die Analysen selbst auf unterschiedliche Aspekte der Datenerhebung abzielten.

Mittels DLC wurden genaue Koordinaten für einen verfolgten Punkt ermittelt anhand derer mittels MatLab die Distanz zwischen Ober- und Unterschnabel berechnet werden konnte. Es handelt sich hier um quantitative Daten im Sinne einer Verhältnisskala [219, 220]. Gleiches gilt für die Bewegungen einzelner Körperteile welche in Form von zurückgelegten Strecken in konsekutiven Frames in der Einheit Pixel berechnet werden konnte. Während auf diese Weise die Schnabelöffnung quantifiziert und objektiviert werden konnte kann mittels dieser Form der Datenerhebung keine Aussage über die Art der Schnabelöffnung getroffen werden. Wenige weite oder häufige kleine Schnabelöffnungen könnten das gleiche Ergebnis erzielen. In der Auswertung durch die Beobachter wurde angestrebt, diese Lücke zu schließen und ein besseres Verständnis zu bekommen, in welcher Art diese vermehrten Schnabelbewegungen zustande kommen. Hierfür wurden vier Arten der Schnabelbewegungen definiert.

Eine erste Übersicht erfolgte in Form von qualitativen Daten, ein übliches Vorgehen im Bereich der Verhaltensforschung [175]. Die Erhebung qualitativer Daten bedeutet dabei, dass eine Handlung nicht numerisch sondern verbal beschrieben und im Kontext des Auftretens beurteilt wird [221–223]. Erst die Definition der Handlungen als Verhaltensweisen machte eine Art der numerischen Messung und damit die Erfassung als quantitative Daten möglich beispielsweise in Form der Frequenz, in der eine Handlung beobachtet wurde [175]. Jedoch basiert auch dieser Ansatz auf subjektiven Entscheidungen des Forschers, beispielsweise der Definition der Verhaltensweisen [221]. In der durchgeführten Auswertung wurde dann jede Verhaltensweise als binäre Variable betrachtet. Das heißt, das Verhalten wurde in einem spezifischen Zeitraum entweder beobachtet (unabhängig von der Häufigkeit) oder nicht [220]. Diese Art der manuellen Auswertung erlaubt Aussagen darüber, welche Arten an Bewegungen in einem spezifischen Zeitraum beobachtet wurden jedoch nicht über die Frequenz.

Die softwaregestützte Auswertung der vorliegenden Studie zeigt ab ED15 nach einem noxischen Stimulus eine signifikante Zunahme der Schnabelöffnungen. Die manuelle Beobachterausswertung zeigt, dass ab ED16 das Beak Opening und ab ED17 das Wide Beak Opening Arten der Schnabelöffnung darstellen, die regelmäßig nach

einem noxischen Reiz, jedoch nicht nach einem Kontrollreiz oder in der Baseline, auftreten. Die Auswertungen greifen hier ineinander. Da Beak Opening und Wide Beak Opening Bewegungen mit weiten Schnabelöffnungen sind, ist es naheliegend, dass aus den DLC Koordinaten heraus höhere Werte für die Distanz zwischen Ober- und Unterschnabel berechnet werden. Beide Aussagen stützen sich daher gegenseitig. Die Vorteile der softwaregestützten Auswertung liegen in der Erhebung von Daten, welche objektiv messbar sind und keinem menschlichen Einfluss unterliegen. Dies gleicht den Nachteil der menschlichen Beobachtung, welche naturgemäß nicht vollständig objektiv sein kann aus. Gleichzeitig dient die menschliche Beobachtung einer Klassifikation und Einordnung der Bewegungen, welche in gleicher Weise hier nicht durch die von DLC und MatLab generierten Ergebnisse möglich war. Im Hinblick der künftigen Anwendung von Technologie in der Verhaltensforschung sollte bedacht werden, dass die Entwicklung von AI und Softwares ständig voranschreitet. Weiterführende Systeme sind in der Lage, ausgehend von den Daten aus Softwares wie z.B. DLC Verhaltensweisen zu klassifizieren [224–226]. So haben Ferres et al. beispielsweise verschiedene Modelle (u.a. neuronales Netzwerk, Entscheidungsbaum) entwickelt, die ausgehend von der Körperhaltung von Hunden in der Lage sind mit einer Erfolgsquote von über 60% verschiedene Emotionen der Hunde korrekt zu detektieren [227]. Die Autoren verweisen auf eine Studie von Amici et al. zum Thema der menschlichen Fähigkeiten, die Emotionen von Hunden zu erkennen [228]. Im Vergleich weisen die Modelle eine höhere Wahrscheinlichkeit auf als europäische Erwachsene, die Emotionen eines Hundes korrekt in Kategorien einzuordnen [227, 228]. In der Studie von Ferres et al. dient dieser Vergleich einer Einordnung der Erfolgsquote [227]. Mit Blick auf die Zukunft zeigt dies jedoch das Potenzial, das künftig mit dem Einsatz von AI verknüpft sein könnte, um Forscher bei ihrer Arbeit zu unterstützen.

## 9.5 Vergleich zwischen Beobachtern

Die Überprüfung der Zuverlässigkeit von Daten, die von einem einzelnen Beobachter in der Verhaltensforschung erhoben wurden, ist von entscheidender Bedeutung [176, 178]. Da Menschen von Natur aus anfällig für verschiedene Einflüsse sind, die zu Verzerrungen führen können, sollte bei Studien mit nur einem Beobachter eine Validierung der Daten durch einen zweiten Beobachter in Betracht gezogen werden [176, 178]. Eine Überprüfung der Übereinstimmung der Beobachtungen ist hierbei eine gängige Methode [178, 185]. Alternativ stand für die Veröffentlichung als zusätzliches objektives Analyseverfahren die softwaregestützte

Auswertung durch DLC zur Verfügung [7]. Zur Verifizierung der manuellen Auswertung wurde sowohl eine erneute Bewertung durch denselben Beobachter, wie auch eine zusätzliche Bewertung durch einen weiteren Beobachter durchgeführt. Bekannt ist, dass ein einzelner Beobachter in der Lage ist, sehr konsistent zu beobachten und zu bewerten [178]. Dies garantiert jedoch nicht die Korrektheit der Beurteilung [178]. Eine zweite Bewertung kann etwaige Fehler aufdecken oder die Resultate bestätigen [178].

Die größten Differenzen in den Prozentzahlen reagierender Tiere (Tabelle 8.1) traten bei *Beak Shift* und *Mandibulation* auf. Dabei stellte Observer 2 tendenziell häufiger einen *Beak Shift* fest, während Observer 1 häufiger eine *Mandibulation* beobachtete. In der kombinierten Betrachtung beider Bewegungen ähnelten sich die Ergebnisse der prozentualen Anteile reagierender Tiere von Observer 1 (2023 und 2024) und Observer 2 jedoch. Dies legt nahe, dass trotz klarer Definition die Unterscheidung der beiden Bewegungen Schwierigkeiten bereiten kann. Die Auswertung der Übereinstimmungen anhand von Cohen's Kappa bestätigte diese Annahme. Die Koeffizienten für *Beak Shift* und *Mandibulation* sind v.a. in der leOR überwiegend geringer als die für *Beak Opening* und *Wide Beak Opening* (Tabelle 8.4). Die leOR zwischen Observer 1 (2023) und Observer 2 für *Beak Shift* liegt bei 0,41. Dies ist gemäß einer allgemein verwendeten Einteilung noch als moderat einzustufen [185, 186]. Es wird in der Literatur empfohlen, bei niedrigen Kappa-Werten – insbesondere wenn diese negativ sind und somit auf geringere Übereinstimmungen hinweisen als zufällig zu erwarten – einzugreifen und beispielsweise die Beobachter intensiver zu trainieren [187].

Eine vergleichbare Vorgehensweise könnte auch bei einer Fortsetzung dieser Versuche und Auswertungen für die betreffenden Beobachter angewendet werden. Es könnte die Option genutzt werden, für das Training der Beobachter vermehrt mit Video-Beispielen zu arbeiten, um die Unterschiede zwischen den Bewegungen präziser zu differenzieren. Denn obwohl die meisten hier berechneten Werte für Cohen's Kappa mindestens im sogenannten moderaten Bereich liegen, wäre v.a. im Bereich der leOR eine höhere Übereinstimmung erstrebenswert. Autoren sprechen hierbei beispielsweise von 0,8 als wünschenswertem Minimalwert [185].

Für das *Beak Opening* ähnelten sich die Ergebnisse aller drei Auswertungen. Auffällig war hier ein einzelnes Tier, für das in den Auswertungen von 2024 sowohl von Observer 1 als auch von Observer 2 das *Beak Opening* in der *Baseline* beobachtet wurde, jedoch nicht von Observer 1 (2023). Dieser Fall soll als Beispiel dienen, um mögliche Erklärungen für derartige Abweichungen zu analysieren. Möglicherweise hat Observer 1 (2023) das beobachtete Verhalten nicht als *Beak Opening* einge-

stuft, da eine unbewusste Verzerrung vorlag und dieses Verhalten eher nach einem noxischen Reiz als in der *Baseline* zu erwarten war. Dieses Phänomen der „observer bias“ ist weithin bekannt [177]. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Bewegung von Observer 1 (2023) zwar identifiziert wurde, jedoch möglicherweise in eine angrenzende Kategorie eingeordnet wurde; so könnte ein *Beak Opening* beispielsweise als *Mandibulation* oder *Wide Beak Opening* interpretiert worden sein. Treten derartige Fälle regelmäßig auf, so könnte dies darauf hinweisen, dass die Definitionen der Bewegungen nicht eindeutig und ausreichend detailliert formuliert wurden. Wenn Videoaufnahmen zur Auswertung verwendet wurden und diese entsprechend markiert sind, besteht die Option, nachzuvollziehen, ob eine bestimmte Bewegung erfasst wurde und falls ja, wie sie klassifiziert wurde. Im vorliegenden Fall konnten die Unterschiede in dieser Art nachvollzogen werden. Bezüglich der Definitionen von *Mandibulation* und *Beak Opening* könnte das Ausmaß der betroffenen Bewegung als an der Grenze liegend betrachtet werden. Während Observer 1 (2023) die Bewegung noch als Teil der unmittelbar vorher stattfindenden *Mandibulation* einordnete, betrachteten Observer 1 (2024) und Observer 2 sie bereits als eigenständige Bewegung von ausreichendem Ausmaß, um sie als *Beak Opening* zu klassifizieren.

Obwohl die prozentuale Auswertung der Bewegungen für das *Wide Beak Opening* identisch erscheint, belegt Cohen's Kappa, dass lediglich Observer 1 (2023) und Observer 1 (2024) eine vollständige Übereinstimmung in ihrer Bewertung aufwiesen. Zwischen Observer 1 und Observer 2 wurden jedoch zwei Tiere unterschiedlich bewertet. Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit, nicht nur prozentuale Angaben darzustellen [178]. Zwar ist ersichtlich, dass 14 von 16 Tieren das Verhalten zeigten, jedoch wird die Diskrepanz in der Bewertung von zwei Tieren durch Observer 1 und Observer 2 nicht erfasst. Nichtsdestotrotz erreichte Kappa für die  $\kappa_{OR}$  mit 0,91 einen sehr hohen Wert und signalisiert eine hervorragende Übereinstimmung der Beobachter. Für die  $\kappa_{OR}$  wurde ein Wert von 1 erreicht, was bedeutet, dass Observer 1 beide Male exakt gleich bewertet hat.

Es sollte beachtet werden, dass eine hohe Übereinstimmung der Beobachter nicht ausschließt, dass beide möglicherweise einer „observer bias“ unterlagen [177]. Eine hohe Übereinstimmung könnte gegebenenfalls auf einem subjektiven Einfluss in die gleiche Richtung beruhen [177]. Daher wird in der Literatur grundsätzlich eine verblindete Auswertung empfohlen [177]. Aufgrund des Versuchsdesign war dies hier nicht möglich. Die ursprünglichen Beobachtungen von Observer 1 (2023) konnten jedoch durch die objektive softwaregestützte Analyse bestätigt werden, sodass ein relevanter subjektiver Einfluss der Beobachter ausgeschlossen werden konnte [7].

## 9.6 Komplementäre Studien und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Bewegungsanalyse entstand als Teil einer dreiteiligen Studie zu Schmerzempfinden und Nozizeption im Hühnerembryo. In einem anderen Teil wurde in einem ähnlichem Setup mittels eines arteriellen Tip-Katheters Blutdruck und Herzfrequenz der Embryonen vor und nach noxischem Reiz untersucht. Der mittlere arterielle Blutdruck erwies sich als sensitiver Parameter für Hühnerembryonen [8]. Ein Anstieg des Blutdruck gilt im praktischen klinischen Umfeld als Reaktion auf einen nozizeptiven Reiz [229].

Weiss et al. berichten, dass ab ED16 die Hühnerembryonen einen signifikanten Anstieg im mittleren arteriellen Blutdruck nach dem mechanischen Reiz am Schnabel zeigten [8]. Vereinzelt zeigten auch Embryonen an ED15 bereits einen Anstieg [8]. Die Ergebnisse decken sich dahingehend mit den Ergebnissen der Bewegungsanalyse, dass Bewegungsreaktionen auf einen noxischen Reiz ab ED15 zu beobachten sind [7]. Beide Teile der Studie stützen sich damit gegenseitig in ihrer Interpretation, dass beginnend an ED15, aber spätestens ab ED16 von einer funktionierenden Nozizeption ausgegangen werden kann [7, 8].

Ein weiterer Teil der Studie setzte sich mit den Gehirnaktivitäten von Hühnerembryonen auseinander [9]. Der früheste Bruttag, an dem ein physiologisches EEG nachgewiesen werden konnte war ED13 [9]. Eine Reaktion auf einen noxischen Reiz konnte im EEG nicht abgebildet werden [9]. Mit Einsetzen der physiologischen Gehirnaktivität kann jedoch nicht mehr ausgeschlossen werden, dass ein noxischer Reiz als Schmerz wahrgenommen wird [9]. Dies erwies sich letztlich als ausschlaggebend dafür, ab welchem Bruttag Hühnerembryonen geschützt werden sollten. 2024 ist in Deutschland eine Änderung im Tierschutzgesetz in Kraft getreten [10]. Gemäß §4c ist es verboten, Hühnerembryonen nach Tag 13 in Folge von *in ovo* Geschlechtsbestimmungsverfahren zu töten bzw. den Brutvorgang abubrechen [1]. Während dieses Gesetz in erster Linie die Branche der Hühnerproduktion beeinflusst, sind langfristig auch Auswirkungen auf den Forschungsbereich denkbar. Hühnerembryonen sind in verschiedenen Bereichen der Forschung beliebt [21–24]. Geschützt werden gemäß der EU Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere jedoch nur lebende nicht-menschliche Wirbeltiere, einschließlich selbständig Nahrung aufnehmender Larven und Feten von Säugetieren ab dem letzten Drittel ihrer normalen Entwicklung [230]. Die Richtlinie gilt auch, falls Tiere früherer Entwicklungsstadien betroffen sind, über diese Stadien hinaus weiterleben sollen und infolge der durchgeführten Versuche Schmerzen, Leiden, Schäden oder Ängste erleben [230]. Daraus resultierend gibt es in Deutschland aktuell keine rechtlich bindenden Vorschriften bezüglich der Nutzung von befruch-

teten Hühnereiern bzw. Hühnerembryonen in Versuchen und dementsprechend auch keine Maßnahmen für ihren Schutz solange es nicht zum Schlupf der Hühnerembryonen kommt [230, 231]. Stattdessen gelten Hühnerembryonen als Replacement Methode im Sinne der 3R (Reduction, Replacement, Refinement) [232]. Ein aktuelles Review aus dem Bereich der Onkologie zeigt, dass befruchtete Hühnereier oftmals bis ED16 und auch darüber hinaus für Versuche genutzt werden [25]. Auch in anderen Bereichen werden Hühnerembryonen fortgeschrittener Entwicklungsstadien zum Teil invasiven Eingriffen ausgesetzt. Beispielsweise dienen sie an ED18 als Modell zum Herzultraschall, wobei eine transthorakale Katheterisierung des Herzens Teil des Eingriffes ist [233]. Gleichzeitig sind Informationen zu Anästhesie und Analgesie Methoden bei Hühnerembryonen, welche von Forschenden freiwillig genutzt werden könnten, bisher wenig verbreitet.

Hühnerembryonen ab ED13, spätestens aber ab ED15, potenziell schmerzhaften Versuchen zu unterziehen, obwohl ein Schmerzempfinden nicht mehr ausgeschlossen bzw. von Nozizeption ausgegangen werden kann, ist als kritisch zu sehen. Auch die Einordnung als Replacement Methode ist in diesen Entwicklungsstadien nicht mehr als angemessen anzusehen.

Die Erkenntnisse dieser dreiteiligen Studie könnten daher langfristig die Bedingungen zur Nutzung von befruchteten Hühnereiern oder Hühnerembryonen verändern und den Schutz der Hühnerembryonen in den Fokus setzen. Die Entwicklung von wirksamen Analgesie- und Anästhesieprotokollen, welche Forschende für die im Versuch verwendeten Hühnerembryonen anwenden können, gewinnt damit an Relevanz. Bisher existieren hier nur wenige konkrete Vorschläge, beispielsweise in einer Veröffentlichung von Horr et al. welche sich größtenteils auf Methoden zur Anästhesie bezieht [202]. Weitere Studien sind hier erforderlich. Darüber hinaus sollten ethisch angemessene Euthanasie-Methoden für Hühnerembryonen genutzt werden. Informationen zur Art der Tötung werden nicht standardmäßig in entsprechenden Veröffentlichungen genannt [25]. Aleksandrowicz und Herr haben bereits 2015 eine medikamenteninduzierte Euthanasie als ethisch vertretbare Methode zur Euthanasie vorgeschlagen [234]. Genutzte Methoden sind daneben aber auch die Dekapitation und das Einfrieren der Hühnerembryonen [25]. Ein rechtlicher Rahmen oder Richtlinien könnten hier den Einsatz tierschutzgerechter Euthanasie-Methoden für Hühnerembryonen in der Forschung gewährleisten bzw. fördern.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit war keine rechtliche oder ethische Genehmigung nötig. Langfristig jedoch könnten Hühnerembryonen, vergleichbar anderen Versuchstieren und Säugetierembryonen, in die Gesetzgebung mit aufgenommen werden, um ihnen den nötigen Schutz zu bieten. Eine entsprechende Forderung

wurde 2024 von der Bundestierärztekammer im Rahmen einer Stellungnahme zur Änderung des Tierschutzgesetzes formuliert [232].



# 10. Zusammenfassung

Das Verbot des Kükentötens in Deutschland führte zu einer Debatte über eine vergleichbare Gesetzgebung für Hühnerembryonen, welche nach *in ovo* Geschlechtsbestimmungsverfahren getötet würden. Der determinierende Faktor für den Zeitpunkt, ab dem ein entsprechender Schutz nötig wird, war die Fähigkeit der Embryonen zu Nozizeption und Schmerzwahrnehmung. Studien zeigten, dass beides vor dem 7. Bruttag ausgeschlossen, ab dem 14. Bruttag jedoch wahrscheinlich ist. Ein Gesetzentwurf verbot daraufhin das Töten von Hühnerembryonen nach Geschlechtsbestimmungsverfahren ab Bruttag 7. Da die Datenlage unzureichend war, wurde ein dreiteiliges Forschungsvorhaben (Hämodynamische Parameter, Verhaltensparameter, EEG-Messungen) gestartet, um den Zeitraum, ab welchem Hühnerembryonen zu Nozizeption und Schmerzempfinden fähig sind, genauer einzugrenzen.

Die vorliegende Studie untersuchte in einem exploratorischen Ansatz Hühnerembryonen an ED9 und ED12 bis ED18 daraufhin, ob und ab wann sie durch Verhaltensänderungen oder spezifischen Bewegungen nach einem noxischen Reiz Anzeichen für eine funktionierende Nozizeption zeigen. Hierfür wurden an der Schnabelbasis ein noxischer Stimulus und ein Kontrollstimulus in randomisierter Reihenfolge appliziert und Bewegungen vor und nach der Applikation anhand von Videoaufnahmen ausgewertet. Eine Software (DeepLabCut, markerless pose estimation) wurde trainiert, Körperteile der Embryonen zu erkennen und deren Bewegungen über den Verlauf der Videoaufnahme hinweg zu verfolgen. So wurden die Bewegungen von Schnabel, Kopf, Flügel und Bein überwacht. Die Bewegungen wurden hinsichtlich ihres Ausmaßes und auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin ausgewertet.

Die Art der Schnabelbewegungen wurde manuell bewertet. Zur Verifizierung der Auswertung wurden die Daten durch denselben und einen weiteren Beobachter erneut bewertet und die Übereinstimmung mittels Cohen's Kappa geprüft.

Veränderungen im Verhalten nach dem noxischen Stimulus am Schnabel traten bei Embryonen an ED15 bis ED18 in Form einer Zunahme der Schnabelöffnungen auf. Darüber hinaus nahmen an ED18 unmittelbar nach dem noxischen Reiz auch die

Körperbewegungen zu. Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten sich gelegentlich, jedoch ohne erkennbares Muster. Die manuelle Differenzierung der Schnabelbewegungen ergab, dass *Beak Opening* und *Wide Beak Opening* (ab ED16 bzw. ED17) weitgehend spezifische Reaktionen auf den noxischen Reiz darstellen.

Zusammenfassend ist der 15. Bruttag das früheste Stadium, an dem eine Reaktion auf den noxischen Stimulus beobachtet werden konnte, was auf eine funktionierende Nozizeption hindeuten könnte.

Die kombinierten Ergebnisse aller Studienteile führten zu einer Anpassung des Gesetzentwurfs. An Bruttag 13 konnten physiologische Gehirnaktivitäten nachgewiesen werden. Basierend darauf lässt sich eine mögliche Wahrnehmung von Schmerz nicht mehr ausschließen. Seit 2024 ist daher das Töten von Hühnerembryonen nach *in ovo* Geschlechtsbestimmung ab dem 13. Bruttag untersagt.

# 11. Summary

The ban on chick culling in Germany led to a debate about a comparable law for chicken embryos, which would be culled following *in ovo* sex determination procedures. The determining factor for the timing at which such protection becomes necessary was the ability of the embryos to perceive nociception and pain. Studies showed that both can be ruled out before day 7 of incubation but are likely from day 14 onwards. Consequently, a draft law was planned prohibiting the culling of chicken embryos after sex determination procedures from day 7 of incubation. Considering the lack of adequate data, a three-part research project (hemodynamic parameters, behavioral changes, EEG measurements) was initiated to more accurately determine the period in which chicken embryos develop the ability for nociception and pain perception.

One part of the study used an exploratory approach by examining chicken embryos at ED9 and ED12 to ED18 to determine whether and when they show signs of functioning nociception in the form of behavioral changes or specific movements following a noxious stimulus. For this purpose, a noxious stimulus and a control stimulus were applied to the base of the beak in randomized order and movements before and after application were evaluated using video recordings. A software (DeepLabCut, markerless pose estimation) was trained to recognize body parts of the embryos and to track their movements throughout the video recording. Thus, the movements of the beak, head, wings, and legs were monitored. The movements were evaluated in terms of their extent and gender-specific differences. The type of beak movement was evaluated manually. To verify the evaluation, the data were re-evaluated by the same and another observer and the agreement was measured using Cohen's Kappa.

Behavioral changes following the noxious stimulus at the beak were observed in embryos at ED15 to ED18 manifesting as an increase in beak openings. In addition, on ED18, body movements also increased immediately after the noxious stimulus. Gender-specific differences were occasionally observed but showed no discernible pattern.

The manual differentiation of the beak movements revealed that *Beak Opening* and *Wide Beak Opening* (from ED16 and ED17 respectively) are to a large extent specific responses to the noxious stimulus.

In summary, the 15th day of incubation is the earliest stage at which a response to the noxious stimulus could be observed, suggesting functional nociception from this point.

The combined results of all parts of the study led to an adjustment of the draft law. On day 13 of incubation, physiological brain activity could be detected. Based on this, the potential perception of pain can no longer be ruled out. Hence, since 2024, the killing of chicken embryos after *in ovo* sex determination has been prohibited from the 13th day of incubation.

## 12. Literaturverzeichnis

1. *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.* Abgerufen am 25.05.2024. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>.
2. BMEL. *Verbot des Kükentötens.* Abgerufen am 17.08.2024. <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/tierwohl-forschung-in-ovo.html>.
3. BVerwG. *Urteil vom 13.06.2019 - 3 C 28.16. Untersagung des Tötens männlicher Küken.* Abgerufen am 17.08.2024. <https://www.bverwg.de/130619U3C28.16.0>.
4. Weissmann, A., Reitemeier, S., Hahn, A., Gottschalk, J. & Einspanier, A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology* **80**, 199–205 (2013).
5. Bartels, T., Wilk, I. & Schrader, L. Entwicklung von Nozizeption und Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen:[Stellungnahme des FLI]. *Informationen des FLI: Empfehlungen und Informationen.* (2020).
6. BMEL. *Studie: Kein Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen vor dem 13. Bebrütungstag* Abgerufen am 10.09.2024. <https://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2023/036-schmerzempfinden-huehnerembryonen.html>.
7. Süß, S. C. *et al.* Nociception in chicken embryos, Part III: Analysis of movements before and after application of a noxious stimulus. *Animals* **13**, 2859 (2023).
8. Weiss, L. *et al.* Nociception in chicken embryos, Part I: Analysis of cardiovascular responses to a mechanical noxious stimulus. *Animals* **13**, 2710 (2023).

9. Kollmansperger, S. *et al.* Nociception in Chicken Embryos, Part II: Embryonal Development of Electroencephalic Neuronal Activity In Ovo as a Prerequisite for Nociception. *Animals* **13**, 2839 (2023).
10. *Artikel 2a Gesetz zur Änderung des Öko-Landbaugesetzes, des Öko-Kennzeichengesetzes und des Gesetzes zur Änderung des Tierschutzgesetzes - Verbot des Kükentötens G. v. 17. August 2023 BGBl. 2023 I Nr. 219 m.W.v. 24. August 2023.* Abgerufen am 17.08.2024. <https://www.recht.bund.de/bgb1/1/2023/219/V0.html>.
11. Bellairs, R. & Osmond, M. *The Hen's Egg and its Formation in Atlas of Chick Development* (Hrsg. Bellairs, R. & Osmond, M.) 3. Aufl. (Academic Press, Cambridge,USA, 2014).
12. Bellairs, R. & Osmond, M. *Early Stages in Atlas of Chick Development* (Hrsg. Bellairs, R. & Osmond, M.) 3. Aufl., 15–28 (Academic Press, Cambridge,USA, 2014).
13. Kressin, M. *Embryonalhüllen des Vogels in Embryologie der Haustiere* (Hrsg. Kressin, M. & Brehm, R.) 7. Aufl., 166–168 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2019).
14. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* **195**, 231–272 (1992).
15. Einspanier, A., Reitemeier, S. & Weißmann, A. *Reproduktion beim Vogel in Physiologie der Haustiere* (Hrsg. Breves, G., Diener, M. & Gäbel, G.) 6. Aufl., 615–629 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2022).
16. Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. *Harn- und Geschlechtsapparat, Apparatus urogenitalis [Systemaurogenitale] in Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band V Anatomie der Vögel* (Hrsg. Vollmerhaus, B.) 3. Aufl., 224–264 (Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany, 2004).
17. Bellairs, R. & Osmond, M. *Extra-Embryonic Membranes in Atlas of Chick Development* (Hrsg. Bellairs, R. & Osmond, M.) 3. Aufl., 127–129 (Academic Press, Cambridge,USA, 2014).
18. Overton, J. Fusion of epithelial sheets as seen in formation of the chick amnion. *Cell Tissue Res.* **257**, 141–147 (1989).
19. Moran Jr, E. T. J. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poult. Sci.* **86**, 1043–1049 (2007).

20. Romanoff, A. L. *Chapter Thirteen. The Extraembryonic Membranes in The avian embryo: structural and functional development* 1039–1140 (The Macmillan Company, New York, USA, 1960).
21. Stern, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. *Dev. Cell* **8**, 9–17 (2005).
22. Bednarczyk, M., Dunislawska, A., Stadnicka, K. & Grochowska, E. Chicken embryo as a model in epigenetic research. *Poult. Sci.* **100**, 101164 (2021).
23. Ribatti, D. & Annese, T. Chick embryo in experimental embryology and more. *Pathol. Res. Pract.*, 154478 (2023).
24. Kain, K. H. *et al.* The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev. Dyn.* **243**, 216–228 (2014).
25. Mesas, C. *et al.* Experimental Tumor Induction and Evaluation of Its Treatment in the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 837 (2024).
26. Wolpert, L. Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. *Mech. Dev.* **121**, 1015–1017 (2004).
27. Vimalraj, S., Renugaa, S. & Dhanasekaran, A. Chick embryo chorioallantoic membrane: A biomaterial testing platform for tissue engineering applications. *Process Biochem.* **124**, 81–91 (2023).
28. Romanoff, A. L. Cultivation of the early chick embryo in vitro. *Anat. Rec.* **87**, 365–369 (1943).
29. Romanoff, A. L. Cultivation of the chick embryo in an opened egg. *Anat. Rec.* **48**, 185–189 (1931).
30. Tahara, Y. & Obara, K. Ex Ovo Culture System for Avian Embryos and its Application. *J. Poult. Sci.* **58**, 1–4 (2021).
31. Bellairs, R. & Osmond, M. *Techniques in Atlas of Chick Development* (Hrsg. Bellairs, R. & Osmond, M.) 3. Aufl., 7–14 (Academic Press, Cambridge, USA, 2014).
32. Spurlin III, J. & Lwigale, P. A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for in ovo manipulations. *Dev. Dyn.* **242**, 148–154 (2013).
33. Kulesa, P. M., Bailey, C. M., Cooper, C. & Fraser, S. E. In ovo live imaging of avian embryos. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb-prot5446 (2010).

34. Andacht, T., Hu, W. & Ivarie, R. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Mol. Reprod. Dev.* **69**, 31–34 (2004).
35. Luo, J. & Redies, C. Ex ovo electroporation for gene transfer into older chicken embryos. *Dev. Dyn.* **233**, 1470–1477 (2005).
36. Borwompinyo, S., Brake, J., Mozdziak, P. & Petite, J. Culture of chicken embryos in surrogate eggshells. *Poult. Sci.* **84**, 1477–1482 (2005).
37. Perry, M. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* **331**, 70–72 (1988).
38. Liu, C., Zu, J., Baskar, V., Wernery, U. & Chang, I. K. Culture of chicken embryo in interspecific surrogate egg white. *Poult. Sci.* **91**, 2866–2871 (2012).
39. Yang, H. *et al.* Research Note: Embryonic viability by weight difference between donor and surrogate eggs in a surrogate eggshell incubation system. *Poult. Sci.* **101**, 101733 (2022).
40. Rowlett, K. & Simkiss, K. Explanted embryo culture: In vitro and in ovo techniques for domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* **28**, 91–101 (1987).
41. New, D. A. T. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Development* **3**, 326–331 (1955).
42. Tahara, Y. & Obara, K. A novel shell-less culture system for chick embryos using a plastic film as culture vessels. *J. Poult. Sci.* **51**, 307–312 (2014).
43. Yalcin, H. C., Shekhar, A., Rane, A. A. & Butcher, J. T. An ex-ovo Chicken Embryo Culture System Suitable for Imaging and Microsurgery Applications. *J. Vis. Exp.*, e2154 (2010).
44. Dugan Jr, J. D., Lawton, M. T., Glaser, B. & Brem, H. A new technique for explantation and in vitro cultivation of chicken embryos. *Anat. Rec.* **229**, 125–128 (1991).
45. Dunn, B. E. Shell-less culture system for chick embryos from the blastoderm stage to hatching. *J. Exp. Zool.* **339**, 411–422 (2023).
46. Raja, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *PAIN* **161**, 1976–1982 (2020).
47. Le Neindre, P. *et al.* Animal consciousness. *EFSA Supporting Publications* **14**, 1196E (2017).



48. Sann, H. *Nozizeption und Schmerz in Physiologie der Haustiere* (Hrsg. Breves, G., Diener, M. & Gäbel, G.) 6. Aufl., 74–81 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2022).
49. Livingston, A. *Pain and analgesia in domestic animals in Comparative and veterinary pharmacology* (Hrsg. Cunningham, F., Elliot, J. & Lees, P.) 1. Aufl., 159–189 (Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2010).
50. Anil, S. S., Anil, L. & Deen, J. Challenges of pain assessment in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **220**, 313–9 (2002).
51. Zimmermann, M. *Behavioural investigations of pain in animals in Assessing Pain in Farm animals* (Hrsg. Duncan, I. J. H. & Molony, V.) (Comission of the European Communities, Luxembourg, 1986), 16–29.
52. Mikoni, N. A., Guzman, D. S.-M. & Paul-Murphy, J. Pain Recognition and Assessment in Birds. *et. Clin. N. Am. - Exot. Anim. Pract.* **26**, 65–81 (2023).
53. Henke, J., Tacke, S. & Erhardt, W. *Analgesie in Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier* (Hrsg. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C. & Tacke, S.) 2. Aufl., 385–431 (Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany, 2011).
54. Bell, A. The neurobiology of acute pain. *Vet. J.* **237**, 55–62 (2018).
55. Dubin, A. E. & Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Investig.* **120**, 3760–3772 (2010).
56. Shekhar, V., Choudhary, N., Rathore, P., Singh, S. P. & Bhatnagar, S. Non-Invasive Objective Markers to Measure Pain: A Direction to Develop a Pain Device - A Narrative Review. *Indian J. Palliat. Care* **29**.
57. Molony, V. & Kent, J. E. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.* **75**, 266–272 (1997).
58. Thomas, E. Descartes on the Animal Within, and the Animals Without. *Can. J. Philos.* **50**, 999–1014 (2020).
59. Beausoleil, N., Holdsworth, S. & Lehmann, H. *Avian nociception and pain in Sturkie's Avian Physiology* (Hrsg. Scanes, C. & Dridi, S.) 7. Aufl., 223–231 (Academic Press, Cambridge, USA, 2022).
60. Douglas, J. M., Guzman, D. S.-M. & Paul-Murphy, J. R. Pain in birds: The anatomical and physiological basis. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* **21**, 17–31 (2018).

61. Gentle, M. J. Pain in Birds. *Anim. Welf.* **1**, 235–247 (1992).
62. Jarvis, E. D. *et al.* Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 151–159 (2005).
63. Woolf, C. J. & Ma, Q. Nociceptors—noxious stimulus detectors. *Neuron* **55**, 353–364 (2007).
64. Lumpkin, E. A. & Caterina, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* **445**, 858–865 (2007).
65. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203–210 (2001).
66. Whiteside, D. P. *Analgesia in Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia* (Hrsg. West, G., Heard, D. & Caulkett, N.) 2. Aufl., 83–108 (John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey, USA, 2014).
67. Dubbeldam, L. J. The Trigeminal System in Birds and Nociception. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **9**, 150–158 (2009).
68. Paul-Murphy, J. R. & Hawkins, M. *Bird-Specific Considerations: Recognizing Pain Behavior in Pet Birds in Handbook of Veterinary Pain Management* (Hrsg. Gaynor, J. S. & Muir, W. W.) 3. Aufl., 536–554 (Mosby, St. Louis, USA, 2014).
69. Machin, K. L. Avian pain: physiology and evaluation. *Compend. contin. educ. pract. vet.* **27**, 98–109 (2005).
70. Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. *Nervensystem, Systema nervosum in Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band V Anatomie der Vögel* (Hrsg. Vollmerhaus, B.) 3. Aufl., 331–364 (Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 2004).
71. Giordano, J. *The Neurobiology of pain in Pain management: A practical Guide for Clinicians* (Hrsg. Weiner, R.) 6. Aufl., 1089–1100 (CRC Press, Boca Raton, USA, 2002).
72. Woodbury, C. J. Two spinal cords in birds: novel insights into early avian evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **265**, 1721–1729 (1998).
73. Wild, J. M., Krützfeldt, N. O. & Altshuler, D. L. Trigeminal and spinal dorsal horn (dis)continuity and avian evolution. *Brain Behav. Evol.* **76**, 11–19 (2010).
74. Rexed, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* **96**, 415–495 (1952).

75. Todd, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 823–836 (2010).
76. Reiner, A., Davis, B. M., Brecha, N. C. & Karten, H. J. The distribution of enkephalinlike immunoreactivity in the telencephalon of the adult and developing domestic chicken. *J. of Comp. Neurol.* **228**, 245–262 (1984).
77. Tracey, I. & Johns, E. The pain matrix: reloaded or reborn as we image tonic pain using arterial spin labelling. *Pain* **148**, 359–360 (2010).
78. Duerden, E. G. & Albanese, M.-C. Localization of pain-related brain activation: A meta-analysis of neuroimaging data. *Hum. Brain Mapp.* **34**, 109–149 (2013).
79. Williams, C. J., James, L. E., Bertelsen, M. F. & Wang, T. Analgesia for non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Physiol.* **11**, 75–84 (2019).
80. Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. *Nervensystem in Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen* (Hrsg. Vollmerhaus, B.) 4. Aufl., 2–384 (Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany, 2004).
81. McIlhhone, A. E., Beausoleil, N. J., Kells, N. J., Mellor, D. J. & Johnson, C. B. Effects of noxious stimuli on the electroencephalogram of anaesthetised chickens (*Gallus gallus domesticus*). *PLoS One* **13**, e0196454 (2018).
82. Kuenzel, W. J., Medina, L., Csillag, A., Perkel, D. J. & Reiner, A. The avian subpallium: new insights into structural and functional subdivisions occupying the lateral subpallial wall and their embryological origins. *Brain Res.* **1424**, 67–101 (2011).
83. Güntürkün, O. & Bugnyar, T. Cognition without cortex. *Trends Cogn. Sci.* **20**, 291–303 (2016).
84. Güntürkün, O. The avian ‘prefrontal cortex’ and cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 686–693 (2005).
85. Dugas-Ford, J., Rowell, J. J. & Ragsdale, C. W. Cell-type homologies and the origins of the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 16974–16979 (2012).
86. Tan, L. L. & Kuner, R. Neocortical circuits in pain and pain relief. *Nat. Rev. Neurosci.* **22**, 458–471 (2021).
87. Yen, C. T. & Lu, P. L. Thalamus and pain. *Acta. Anaesthesiol. Taiwan* **51**, 73–80 (2013).

88. Wang, Y., Brzozowska-Prechtl, A. & Karten, H. J. Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12676–12681 (2010).
89. Bellieni, C. V. New insights into fetal pain. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **24**, 101001 (2019).
90. Derbyshire, S. W. & Bockmann, J. C. Reconsidering fetal pain. *J. Med. Ethics* **46**, 3–6 (2020).
91. Anand, K. J. & Hickey, P. R. Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1321–9 (1987).
92. Goksan, S. *et al.* fMRI reveals neural activity overlap between adult and infant pain. *eLife* **4**, e06356 (2015).
93. Thill, B. The fetal pain paradox. *Front. Pain Res.* **4**, 1128530 (2023).
94. Bellieni, C. V. Analgesia for fetal pain during prenatal surgery: 10 years of progress. *Pediatr. Res.* **89**, 1612–1618 (2021).
95. Sekulic, S. *et al.* Appearance of fetal pain could be associated with maturation of the mesodiencephalic structures. *J. Pain Res.* **9**, 1031–1038 (2016).
96. Underwood, W. & Anthony, R. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Retrieved on March 2013* (American Veterinary Medical Association, Schaumburg, USA, 2020).
97. Lee, M. C., Mouraux, A. & Iannetti, G. D. Characterizing the cortical activity through which pain emerges from nociception. *J. Neurosci.* **29**, 7909–7916 (2009).
98. Lowery, C. L. *et al.* Neurodevelopmental Changes of Fetal Pain. *Semin. Perinatol.* **31**, 275–282 (2007).
99. Lee, S. J., Ralston, H. J. P., Drey, E. A., Partridge, J. C. & Rosen, M. A. Fetal pain: a systematic multidisciplinary review of the evidence. *Jama* **294**, 947–954 (2005).
100. Thill, B. Fetal Pain in the First Trimester. *Linacre Q.* **89**, 73–100 (2022).
101. Chatelle, C. *et al.* Mesurer la douleur chez le patient non communicant. *Rev. Med. Liege* **63**, 429–37 (2008).
102. Perry, M. *et al.* Neonatal Pain: Perceptions and Current Practice. *Crit. Care Nurs. Clin. N. Am.* **30**, 549–561 (2018).

103. Norton, M. E. *et al.* Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #59: The use of analgesia and anesthesia for maternal-fetal procedures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **225**, B2–B8 (2021).
104. Kostovic, I. & Rakic, P. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J. Comp. Neurol.* **297**, 441–470 (1990).
105. Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 110–22 (2008).
106. Hoerder-Suabedissen, A. & Molnár, Z. Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 133–146 (2015).
107. Judaš, M., Sedmak, G. & Pletikos, M. Early history of subplate and interstitial neurons: from Theodor Meynert (1867) to the discovery of the subplate zone (1974). *J. Anat.* **217**, 344–67 (2010).
108. Hadders-Algra, M. Early human brain development: Starring the subplate. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **92**, 276–290 (2018).
109. Merker, B. Consciousness without a cerebral cortex: A challenge for neuroscience and medicine. *Behav. Brain Sci.* **30**, 63–81 (2007).
110. Bracke, M. B. & Hopster, H. Assessing the importance of natural behavior for animal welfare. *J. Agric. Environ. Ethics* **19**, 77–89 (2006).
111. Hillel, J. *et al.* Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet. Sel. Evol.* **35**, 1–25 (2003).
112. Bessei, W. & Reiter, K. *Verhalten von Hühnern in Nutztierethologie* (Hrsg. Steffen, H.) 204–223 (Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Deutschland, 2009).
113. Robinson, T. P. *et al.* Mapping the global distribution of livestock. *PLoS One* **9**, e96084 (2014).
114. Stevens, L. *The history and evolution of the domestic fowl* in *Genetics and Evolution of the Domestic Fowl* (Hrsg. Stevens, L.) 1–14 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1991).
115. Siegel, P. B., Honaker, C. F. & Scanes, C. G. *Chapter 8 - Domestication of poultry* in *Sturkie's Avian Physiology* (Hrsg. Scanes, C. G. & Dridi, S.) 7. Aufl., 109–120 (Academic Press, Cambridge, USA, 2022).
116. Campler, M., Jöngren, M. & Jensen, P. Fearfulness in red junglefowl and domesticated White Leghorn chickens. *Behav. Process.* **81**, 39–43 (2009).

117. Engelmann, C. *Verhalten des Geflügels* in *Das Verhalten landwirtschaftlicher Nutztiere* (Hrsg. Porzig, E.) 331–408 (Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, Germany, 1969).
118. Korbelt, R. & Lierz, M. *Vögel in Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier* (Hrsg. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C. & Tacke, S.) 2. Aufl. (Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany, 2011).
119. Mikoni, N. A., Guzman, D. S.-M., Fausak, E. & Paul-Murphy, J. Recognition and Assessment of Pain-Related Behaviors in Avian Species: An Integrative Review. *J. Avian Med. Surg.* **36**, 153–172 (2022).
120. Langford, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* **7**, 447–449 (2010).
121. Hawkins, M. G., Paul-Murphy, J. & Guzman, D. S.-M. *Recognition, assessment, and management of pain in birds* in *Current therapy in avian medicine and surgery* (Hrsg. Speer, B. L.) 1. Aufl., 616–630 (Elsevier, St. Louis, USA, 2015).
122. Machin, K. L. *Recognition and treatment of pain in birds* in *Pain Management in Veterinary Practice* (Hrsg. Egger, C. M., Love, L. & Doherty, T.) 1. Aufl., 407–415 (Wiley-Blackwell, Hoboken, USA, 2013).
123. Turpen, K. K., Welle, K. R., Trail, J. L., Patel, S. D. & Allender, M. C. Establishing stress behaviors in response to manual restraint in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *J. Avian Med. Surg.* **33**, 38–45 (2019).
124. Cortelli, P., Giannini, G., Favoni, V., Cevoli, S. & Pierangeli, G. Nociception and autonomic nervous system. *Neurol. Sci.* **34**, 41–46 (2013).
125. Stout, J. D. Common Emergencies in Pet Birds. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* **19**, 513–41 (2016).
126. Konicek, C. Meister im Verbergen – Notfallmanagement beim Vogel. *kleintier konkret* **24**, 18–29 (2021).
127. *Tierschutzbericht der Bundesregierung 2019 in der Fassung vom 12.11.2019*. Abgerufen am 25.05.2024. 2019. <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/Tierschutzbericht-2019.html>.
128. Gentle, M. & Hunter, L. Physiological and behavioural responses associated with feather removal in *Gallus gallus* var *domesticus*. *Res. Vet. Sci.* **50**, 95–101 (1991).

129. Campo, J. L. & Prieto, M. J. Association between plumage condition and fluctuating asymmetry and between feathers removal, heterophil-to-lymphocyte ratio and tonic immobility duration in chickens. *Arch. fur Geflugelkd.* **73**, 250–256 (2009).
130. Hester, P., Al-Ramamneh, D., Makagon, M. & Cheng, H. W. Effect of partial comb and wattle trim on pullet behavior and thermoregulation. *Poult. Sci.* **94**, 860–866 (2015).
131. Figueiredo, J. P. *et al.* Assessment of brachial plexus blockade in chickens by an axillary approach. *Vet. Anaesth. Analg.* **35**, 511–518 (2008).
132. Lee, H.-Y. & Craig, J. Beak-trimming effects on the behavior and weight gain of floor-reared, egg-strain pullets from three genetic stocks during the rearing period. *Poult. Sci.* **69**, 568–575 (1990).
133. Dennis, R. L. & Cheng, H. W. Effects of beak trimming on pecking force. *Int. J. Poult. Sci.* **9**, 863–866 (2010).
134. Dennis, R. & Cheng, H. W. Effects of different infrared beak treatment protocols on chicken welfare and physiology. *Poult. Sci.* **91**, 1499–1505 (2012).
135. Duncan, I., Slee, G. S., Seawright, E. & Breward, J. Behavioural consequences of partial beak amputation (beak trimming) in poultry. *Br. Poult. Sci.* **30**, 479–488 (1989).
136. Eskeland, B. *Effects of beak trimming* in *Proceedings of the First European Symposium on Poultry Welfare* (Hrsg. Sorensen, Y.) (Danish Branch World's Poultry Science Association, Copenhagen, Denmark, 1981), 193–200.
137. Gentle, M., Hughes, B., Fox, A. & Waddington, D. Behavioural and anatomical consequences of two beak trimming methods in 1- and 10-d-old domestic chicks. *Br. Poult. Sci.* **38**, 453–463 (1997).
138. Gentle, M. J., Waddington, D., Hunter, L. N. & Jones, R. B. Behavioural evidence for persistent pain following partial beak amputation in chickens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **27**, 149–157 (1990).
139. Gentle, M. J., Hunter, L. N. & Corr, S. A. Effects of caudolateral neostriatal ablations on pain-related behaviour in the chicken. *Physiol. Behav.* **61**, 493–498 (1997).
140. Gentle, M. & McKeegan, D. Evaluation of the effects of infrared beak trimming in broiler breeder chicks. *Vet. Rec.* **160**, 145–148 (2007).

141. Kuo, F.-L., Craig, J. & Muir, W. M. Selection and beak-trimming effects on behavior, cannibalism, and short-term production traits in White Leghorn pullets. *Poult. Sci.* **70**, 1057–1068 (1991).
142. Craig, J. & Lee, H.-Y. Beak trimming and genetic stock effects on behavior and mortality from cannibalism in White Leghorn-type pullets. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **25**, 107–123 (1990).
143. Marchant-Forde, R., Fahey, A. & Cheng, H. W. Comparative effects of infrared and one-third hot-blade trimming on beak topography, behavior, and growth. *Poult. Sci.* **87**, 1474–1483 (2008).
144. Gentle, M. J., Hunter, L. N. & Waddington, D. The onset of pain related behaviours following partial beak amputation in the chicken. *Neurosci. Lett.* **128**, 113–116 (1991).
145. Jongman, E., Glatz, P. & Barnett, J. Changes in behaviour of laying hens following beak trimming at hatch and re-trimming at 14 weeks. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* **21**, 291–298 (2008).
146. Van Liere, D. Responsiveness to a novel preening stimulus long after partial beak amputation (beak trimming) in laying hens. *Behav. Process.* **34**, 169–174 (1995).
147. Martinec, V., Bessei, W. & Reiter, K. The influence of beak trimming on feeding activity and pecking of a bunch of feathers in 14-months-old laying hens. *Arch. fur Geflugelkd.* **66**, 193–200 (2002).
148. Blokhuis, H. & Koole, P. Effects of beak trimming and floor type on feed consumption and body weight of pullets during rearing. *Poult. Sci.* **66**, 623–625 (1987).
149. Deaton, J., Lott, B. & May, J. Effect of beak trimming on body weight and feed intake of broiler roasters fed pellets or mash. *Poult. Sci.* **67**, 1514–1517 (1988).
150. Glatz, P. Effect of age of beak trimming on the production performance of hens. *Aust. J. Exp. Agric.* **30**, 349–355 (1990).
151. Glatz, P. C., Murphy, L. & Preston, A. Analgesic therapy of beak-trimmed chickens. *Aust. Vet. J.* **69**, 18 (1992).
152. Glatz, P. Effects of beak trimming and restraint on heart rate, food intake, body weight and egg production in hens. *Br. Poult. Sci.* **28**, 601–611 (1987).



153. Glatz, P. & Lunam, C. Production and heart rate responses of chickens beak-trimmed at hatch or at 10 or 42 days of age. *Aust. J. Exp. Agric.* **34**, 443–447 (1994).
154. Hothersall, B. *et al.* Development of mechanical and thermal nociceptive threshold testing devices in unrestrained birds (broiler chickens). *J. Neurosci. Methods* **201**, 220–227 (2011).
155. Gentle, M. J. & Hill, F. L. Oral lesions in the chicken: behavioural responses following nociceptive stimulation. *Physiol. Behav.* **40**, 781–783 (1987).
156. Wenner, P. A. *Development of the locomotor system—Chick embryo* in *The Neural Control of Movement* (Hrsg. Whelan, P. J. & Sharples, S. A.) 221–236 (Academic Press, Cambridge, USA, 2020).
157. Preyer, W. T. VI. *Die embryonale Sensibilität* in *Specielle Physiologie des Embryo: Untersuchungen über die Lebenserscheinungen vor der Geburt* 465–496 (Th. Grieben's Verlag, Leipzig, Germany, 1885).
158. Hamburger, V. & Balaban, M. Observations and experiments on spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. *Dev. Biol.* **6**, 533–545 (1963).
159. Hamburger, V., Balaban, M., Oppenheim, R. & Wenger, E. Periodic motility of normal and spinal chick embryos between 8 and 17 days of incubation. *J. Exp. Zool.* **159**, 1–13 (1965).
160. Hamburger, V. & Oppenheim, R. Prehatching motility and hatching behavior in the chick. *J. Exp. Zool.* **166**, 171–203 (1967).
161. Hamburger, V., Wenger, E. & Oppenheim, R. Motility in the chick embryo in the absence of sensory input. *J. Exp. Zool.* **162**, 133–159 (1966).
162. Visintini, F. & Levi-Montalcini, R. Relazione tra differenziazione strutturale e funzionale dei centri e delle vie nervose nell'embrione di pollo. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiat* **43**, 150 (1939).
163. Windle, W. F. & Orr, D. W. The development of behavior in chick embryos: spinal cord structure correlated with early somatic motility. *J. Comp. Neurol.* **60**, 287–307 (1934).
164. Lee, M. T., Koebbe, M. J. & Donovan, M. J. The development of sensorimotor synaptic connections in the lumbosacral cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* **8**, 2530 (1988).

165. Wu, K. C., Streicher, J., Lee, M. L., Hall, B. K. & Müller, G. B. Role of motility in embryonic development I: Embryo movements and amnion contractions in the chick and the influence of illumination. *J. Exp. Zool.* **291**, 186–94 (2001).
166. Hamburger, V. Some aspects of the embryology of behavior. *Q. Rev. Biol.* **38**, 342–365 (1963).
167. Watson, S. J. & Bekoff, A. A kinematic analysis of hindlimb motility in 9- and 10-day-old chick embryos. *J. Neurobiol.* **21**, 651–660 (1990).
168. Mackie, N. & McKeegan, D. E. F. Behavioural responses of broiler chickens during low atmospheric pressure stunning. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **174**, 90–98 (2016).
169. Chumak, W. I. *Dinamika reflektomykh reaktsii i vklyuchenie retseptornykh apparatov u embriona kuritsy in Voprosy Fiziologii i Patologii Tsentral'noi Nervnoi Sistemy Cheloveka i Zhivotnykli v Ontogeneze* 63–68 (Sbornik, Moscow, UdSSR, 1961).
170. Levitis, D. A., Lidicker Jr, W. Z. & Freund, G. Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Anim. Behav.* **78**, 103–110 (2009).
171. Kappeler, P. M. *Verhaltensbiologie: Inhalte und Geschichte in Verhaltensbiologie* (Hrsg. Kappeler, P. M.) 3–15 (Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2020).
172. Klopfer, P. H. *Part I. Foundations of Ethology 1850 - 1900 in An Introduction to Animal Behavior: Ethology's First Century* 2. Aufl., 2–29 (Prentice Hall, Englewood Cliffs, USA, 1974).
173. Darwin, C. *On the origin of species: facsimile of the first edition* (John Murray, London, UK, 1859).
174. Bateson, M. & Martin, P. *Recording Technology in Measuring Behaviour: An Introductory Guide* (Hrsg. Bateson, M. & Martin, P.) 4. Aufl., 110–132 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021).
175. Kappeler, P. M. *Methoden und Konzepte der Verhaltensbiologie in Verhaltensbiologie* (Hrsg. Kappeler, P. M.) 17–32 (Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2020).
176. Bateson, M. & Martin, P. *Measurement Quality in Measuring Behaviour: An Introductory Guide* (Hrsg. Bateson, M. & Martin, P.) 4. Aufl., 152–171 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021).

177. Tuytens, F. *et al.* Observer bias in animal behaviour research: can we believe what we score, if we score what we believe? *Anim. Behav.* **90**, 273–280 (2014).
178. Kaufman, A. B. & Rosenthal, R. Can you believe my eyes? The importance of interobserver reliability statistics in observations of animal behaviour. *Anim. Behav.* **78**, 1487–1491 (2009).
179. Freeberg, T. M., Benson, S. A. & Burghardt, G. M. Minimizing observer bias in animal behavior studies revisited: Improvement, but a long way to go. *Ethology* **130**, e13446 (2024).
180. Nickerson, R. S. Confirmation bias: A ubiquitous phenomenon in many guises. *Rev. Gen. Psychol.* **2**, 175–220 (1998).
181. Bateson, M. & Martin, P. *Designing a Behavioural Study in Measuring Behaviour: An Introductory Guide* (Hrsg. Bateson, M. & Martin, P.) 4. Aufl., 41–62 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021).
182. Burghardt, G. M. *et al.* Perspectives-minimizing observer bias in behavioral studies: a review and recommendations. *Ethology* **118**, 511–517 (2012).
183. Marsh, D. M. & Hanlon, T. J. Observer gender and observation bias in animal behaviour research: experimental tests with red-backed salamanders. *Anim. Behav.* **68**, 1425–1433 (2004).
184. Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* **20**, 37–46 (1960).
185. Viera, A. J. & Garrett, J. M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam. Med.* **37**, 360–363 (2005).
186. Landis, J. R. & Koch, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159–174 (1977).
187. McHugh, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem. Med. (Zagreb)* **22**, 276–282 (2012).
188. Delgado, R. & Tibau, X.-A. Why Cohen's Kappa should be avoided as performance measure in classification. *PLoS one* **14**, e0222916 (2019).
189. Von Ziegler, L., Sturman, O. & Bohacek, J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling. *Neuropsychopharmacology* **46**, 33–44 (2021).

190. Choi, R. Y., Coyner, A. S., Kalpathy-Cramer, J., Chiang, M. F. & Campbell, J. P. Introduction to Machine Learning, Neural Networks, and Deep Learning. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **9**, 14–14 (2020).
191. Goodfellow, I., Bengio, Y. & Courville, A. *Introduction in Deep Learning* (Hrsg. Dietterich, T.) 1–26 (MIT Press, Cambridge, USA, 2016).
192. Goodfellow, I., Bengio, Y. & Courville, A. *Part I: Applied Math and Machine Learning Basics in Deep Learning* 27–161 (MIT Press, Cambridge, USA, 2016).
193. Madhusoodanan, J. DeepLabCut: the motion-tracking tool that went viral. *Nature* **629**, 960–961 (2024).
194. Mathis, A. *et al.* DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.* **21**, 1281–1289 (2018).
195. Mathis, M. W. & Mathis, A. Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience. *Curr. Opin. Neurobiol.* **60**, 1–11 (2020).
196. Nath, T. *et al.* Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.* **14**, 2152–2176 (2019).
197. He, K., Zhang, X., Ren, S. & Sun, J. *Deep residual learning for image recognition in 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (IEEE Computer Society, Los Alamitos, USA, 2016), 770–778.
198. Deng, J. *et al.* *ImageNet: A large-scale hierarchical image database in 2009 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops (CVPR Workshops)* (IEEE Computer Society, Los Alamitos, USA, 2009), 248–255.
199. Stanford Vision Lab, Stanford University & Princeton University. *About ImageNet* Abgerufen am 17.08.2024. 2020. <https://www.image-net.org/about.php>.
200. Lauer, J. *et al.* Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut. *Nat. Methods* **19**, 496–504 (2022).
201. Khaliduzzaman, A. *et al.* Non-invasive detection of chick embryo gender based on body motility and a near-infrared sensor. *Eng. Agric. Environ. Food* **14**, 45–53 (2021).
202. Horr, M., Sommerfeld, S., Silva, M. V. & Fonseca, B. B. A fast and simple protocol to anaesthesia in chicken embryos. *Exp. Anim.* **72**, 294–301 (2023).

203. Bradley, N. S. & Jahng, D. Y. Selective effects of light exposure on distribution of motility in the chick embryo at E18. *J. Neurophysiol.* **90**, 1408–1417 (2003).
204. Oppenheim, R. W. & Levin, H. L. Short-term changes in incubation temperature: behavioral and physiological effects in the chick embryo from 6 to 20 days. *Dev. Psychobiol.* **8**, 103–115 (1975).
205. Nechaeva, M. & Turpaev, T. The effect of temperature on the motor activity of the chick embryo and amnion at 5–14 days of development. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* **27**, 743–748 (1991).
206. Marx, V. & Nagy, E. Fetal behavioral responses to the touch of the mother's abdomen: A Frame-by-frame analysis. *Infant Behav. Dev.* **47**, 83–91 (2017).
207. Morsi, A., DeFranco, D. & Witchel, S. F. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the fetus. *Horm. Res. Paediatr.* **89**, 380–387 (2018).
208. Reissland, N., Francis, B. & Mason, J. Can healthy fetuses show facial expressions of “pain” or “distress”? *PLoS One* **8**, e65530 (2013).
209. AboEllail, M. A. M. & Hata, T. Fetal face as important indicator of fetal brain function. *J. Perinat. Med.* **45**, 729–736 (2017).
210. Grunau, R. E., Oberlander, T., Holsti, L. & Whitfield, M. F. Bedside application of the neonatal facial coding system in pain assessment of premature infants. *Pain* **76**, 277–286 (1998).
211. Bernardes, L. S. *et al.* On the feasibility of accessing acute pain-related facial expressions in the human fetus and its potential implications: A case report. *Pain Rep.* **3**, e673 (2018).
212. Failla, M. D. *et al.* Gender differences in pain threshold, unpleasantness, and descending pain modulatory activation across the adult life span: A cross sectional study. *J. Pain* **25**, 1059–1069 (2024).
213. Mogil, J. S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 353–365 (2020).
214. Hendrich, J. *et al.* In Vivo and in Vitro Comparison of Female and Male Nociceptors. *J. Pain* **13**, 1224–1231 (2012).
215. Stratton, H. *et al.* Nociceptors are functionally male or female: from mouse to monkey to man. *Brain* (2024).

216. Harvey, S., Davison, T. F. & Chadwick, A. Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **39**, 270–273 (1979).
217. Banik, R. K., Woo, Y. C., Park, S. S. & Brennan, T. J. Strain and Sex Influence on Pain Sensitivity after Plantar Incision in the Mouse. *Anesthesiology* **105**, 1246–1253 (2006).
218. Marcon, L. *et al.* Understanding sex differences in zebrafish pain- and fear-related behaviors. *Neurosci. Lett.* **772**, 136412 (2022).
219. Philippi, C. L. On Measurement Scales: Neither Ordinal nor Interval? *Philos. Sci.* **88**, 929–939 (2021).
220. Bateson, M. & Martin, P. *Defining Behavioural Metrics* in *Measuring Behaviour: An Introductory Guide* (Hrsg. Bateson, M. & Martin, P.) 4. Aufl., 79–93 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021).
221. Bateson Melissa; Martin, P. *Introduction* in *Measuring Behaviour: An Introductory Guide* (Hrsg. Bateson, M. & Martin, P.) 4. Aufl., 1–10 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021).
222. Tuckerman, J., Kaufman, J. & Danchin, M. How to use qualitative methods for health and health services research. *J. Paediatr. Child Health* **56**, 818–820 (2020).
223. Libarkin, J. C. & Kurdziel, J. P. Research Methodologies in Science Education: The Qualitative-Quantitative Debate. *J. Geosci. Educ.* **50**, 78–86 (2002).
224. Hsu, A. I. & Yttri, E. A. B-SOiD, an open-source unsupervised algorithm for identification and fast prediction of behaviors. *Nat. Commun.* **12**, 5188. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25420-x> (2021).
225. Goodwin, N. L. *et al.* Simple Behavioral Analysis (SimBA) as a platform for explainable machine learning in behavioral neuroscience. *Nat. Neurosci.* **27**, 1411–1424. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01649-9> (2024).
226. Sturman, O. *et al.* Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions. *Neuropsychopharmacol.* **45**, 1942–1952 (2020).
227. Ferres, K., Schloesser, T. & Gloor, P. A. Predicting dog emotions based on posture analysis using deeplabcut. *Future Internet* **14**, 97 (2022).

228. Amici, F., Waterman, J., Kellermann, C. M., Karimullah, K. & Bräuer, J. The ability to recognize dog emotions depends on the cultural milieu in which we grow up. *Sci. Rep.* **9**, 16414 (2019).
229. Ruíz-López, P., Domínguez, J. M. & del Mar Granados, M. Intraoperative nociception-antinociception monitors: A review from the veterinary perspective. *Vet. Anaesth. Analg.* **47**, 152–159 (2020).
230. *RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Aktuelle konsolidierte Fassung: 26/06/2019.* Abgerufen am 24.08.2024. 2010. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
231. *Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. August 2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist.* Abgerufen am 24.08.2024. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>.
232. Bundestierärztekammer e. V. *Stellungnahme Novellierung des Tierschutzgesetzes und des Tiererzeugnisse-Handels-Verbotsgesetzes vom 29.02.2024.* Abgerufen am 21.09.2024. <https://www.bundestieraerztekammer.de/tieraerzte/stellungnahmen/>.
233. Fechner, S., Busch, C., Oppitz, M., Drews, U. & Meyer-Wittkopf, M. The chick embryo as a model for intrauterine ultrasound-guided heart intervention. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **31**, 277–283 (2008).
234. Aleksandrowicz, E. & Herr, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *ALTEX* **32**, 143–147 (2015).

# 13. Abbildungsverzeichnis

3.1	Der Hühnerembryo in der Forschung. Gründe für die Popularität von Hühnerembryonen in der Wissenschaft [14, 22–24, 27]. Grafik erstellt mit Biorender.com . . . . .	7
8.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Parametern <i>Beak Distance</i> , <i>Eye Corner Movement</i> , <i>Elbow Movement</i> und <i>Metatarsus Movement</i> bzw. <i>Tarsus Movement</i> (ED9). Angabe der Anzahl männlicher (m) und weiblicher (w) Embryonen je Versuchsgruppe. Statistische Auswertung mittels robuster linearer gemischter Modelle für alle Analysen. Unterschiede zwischen bestimmten Gruppen wurden nach Modellanpassung anhand der geschätzten marginalen Mittel mit der Tukey-Korrektur des p-Werts für multiple Vergleiche bewertet. Ergebnisse mit $p\text{-Wert} \leq 0,05$ galten als statistisch signifikant. Angabe der p-Werte. Grau: keine signifikanten Unterschiede. Blau: signifikanter Unterschied, männliche Embryonen zeigten vermehrte Bewegungen. Rot: signifikanter Unterschied, weibliche Embryonen zeigten vermehrte Bewegungen. . . . .	58
15.1	Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die <i>Beak Shift</i> vor (BL, Baseline: Grau) und nach <i>Touch</i> (Blau) und <i>Pinch</i> (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024. . . . .	143
15.2	Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die <i>Mandibulation</i> vor (BL, Baseline: Grau) und nach <i>Touch</i> (Blau) und <i>Pinch</i> (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024. . . . .	144
15.3	Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die <i>Beak Shift</i> und / oder <i>Mandibulation</i> vor (BL, Baseline: Grau) und nach <i>Touch</i> (Blau) und <i>Pinch</i> (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024. . . . .	144



15.4 Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Beak Opening* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024. . . . . 145

15.5 Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Wide Beak Opening* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024. . . . . 145

# 14. Tabellenverzeichnis

3.1	Definiton <i>in ovo</i> und <i>ex ovo</i> [30, 31]. . . . .	6
5.1	Übersicht häufig beobachteter schmerzassoziierter Reaktionen und klinischer Symptome von Vögeln. Unterscheidung nach akutem oder chronischem Schmerzerlebnis [50, 52, 60, 69, 118, 121, 122]. . . .	25
5.2	Übersicht über beobachtete Reaktionen und Verhaltensweisen von Hühnervögeln ( <i>Gallus Gallus domesticus</i> ) nach potenziell noxischen mechanischen Reizen. Tabelle modifiziert nach Mikoni et al. [119].	27
5.3	Auftreten von Bewegungen von Hühnerembryonen <i>in ovo</i> ab Beginn der Inkubation bis ED8 nach Hamburger und Balaban (1963) [158].	30
6.1	Werte für Cohen's Kappa. Mögliche Interpretation eines berechneten Wertes für Cohen's Kappa [185, 186] . . . . .	37
8.1	Gegenüberstellung der Auswertungen embryonaler Verhaltensweisen durch verschiedene Beobachter. Prozentualer Anteil an Embryonen einer Versuchsgruppe, die eine definierte Verhaltensweise innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls mindestens einmal gezeigt haben. . . . .	60
8.2	<i>Beak Shift</i> und/oder <i>Mandibulation</i> im Vergleich verschiedener Beobachter. Prozentualer Anteil an Embryonen einer Versuchsgruppe, die <i>Beak Shift</i> und/oder <i>Mandibulation</i> innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls mindestens einmal gezeigt haben. . . . .	60
8.3	Gesamtwerte für Cohen's Kappa. Angabe von Cohen's Kappa für die Intra-observer-reliability, sowie die jeweilige Inter-observer-reliability. Die Berechnung erfolgte übergreifend für alle Bewegungen und über alle Zeitintervalle hinweg. . . . .	61
8.4	Verhaltensindividuelle Werte für Cohen's Kappa. Angabe von Cohen's Kappa für die Intra-observer-reliability, sowie die jeweilige Inter-observer-reliability. Die Berechnung erfolgte für jede Bewegung separat, jedoch über alle Zeitintervalle hinweg . . . . .	61

15.1 Angabe der absoluten Anzahl der Hühnerembryonen an ED18, die eine definierte Verhaltensweise in einem definierten Beobachtungszeitraum gezeigt haben. . . . . 142

# 15. Anhang

## 15.1 Supplemente der Publikation

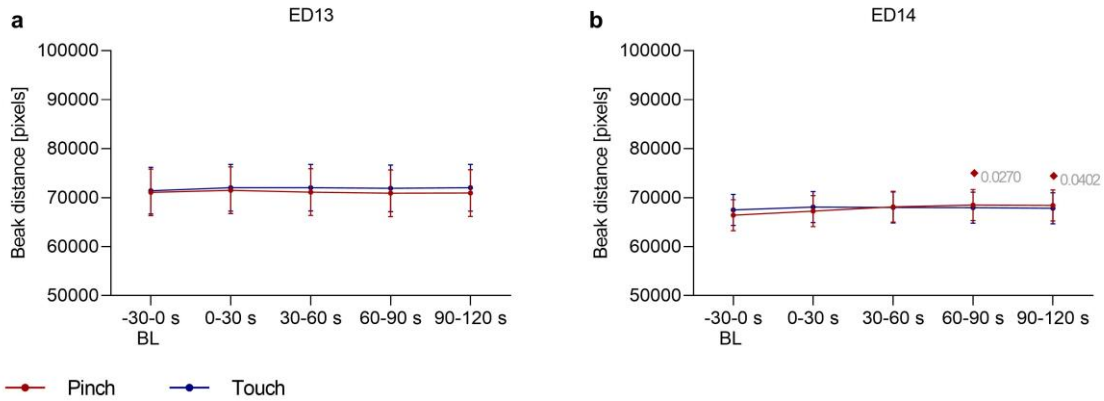
Es folgen die Supplemente zur Veröffentlichung:

"Nociception in Chicken Embryos, Part III: Analysis of Movements before and after Application of a Noxious Stimulus"

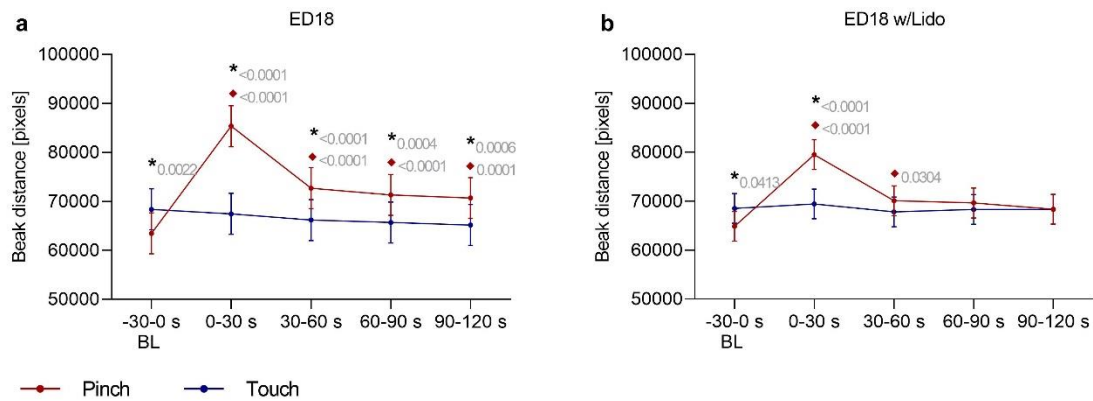
Die Veröffentlichung erfolgte am 08. September 2023 im Journal *Animals*.

## Supplementary Information:

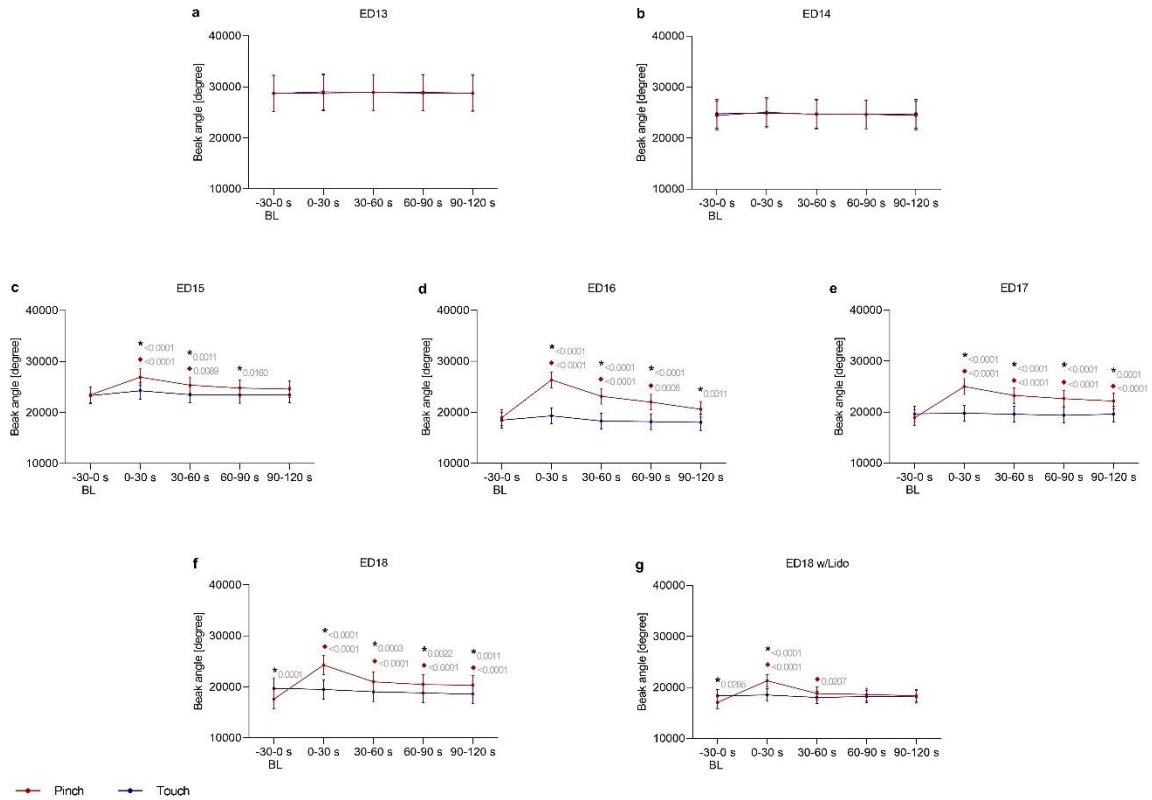
## Nociception in chicken embryos Part III: Analysis of movements before and after application of a noxious stimulus



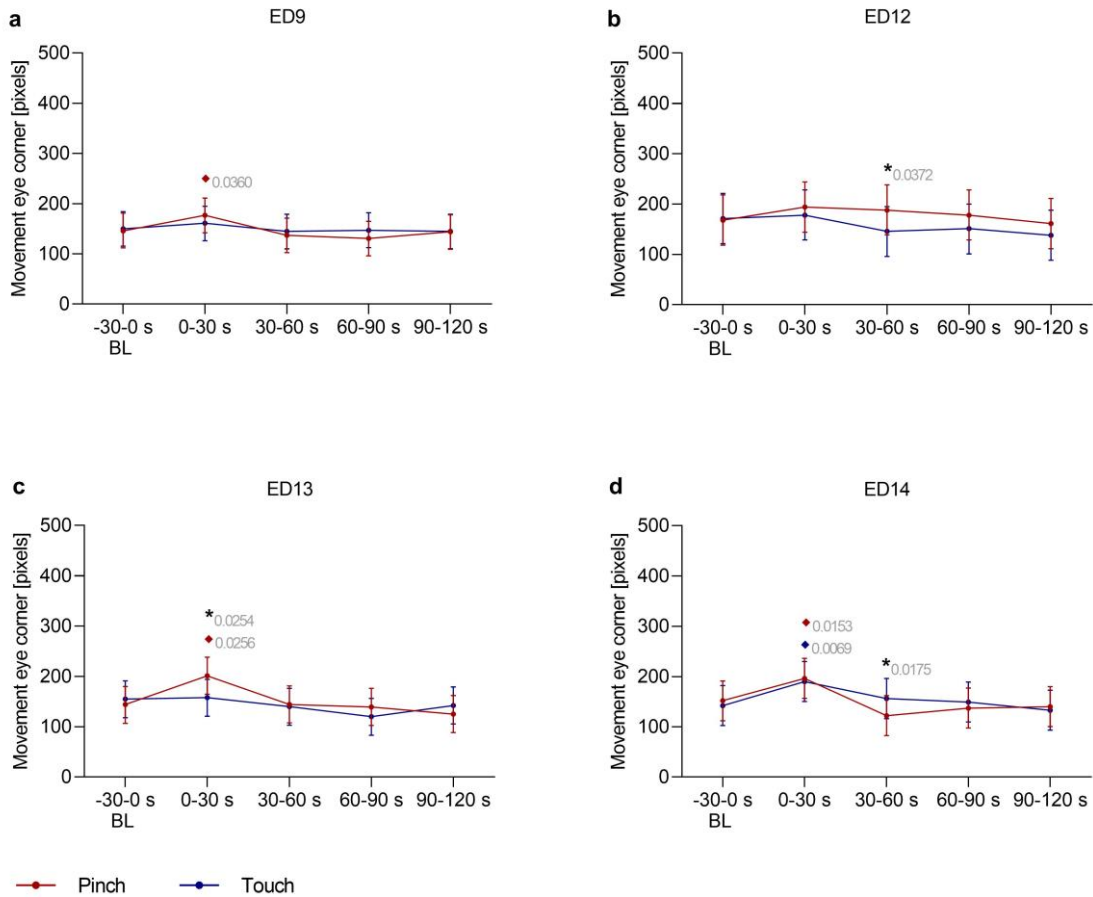
**Figure S1. Beak Distance ED13/ED14.** This variable was defined as the distance between the upper and lower beak of embryos. It was measured at **a** ED13 (n=10) and **b** ED14 (n=15) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30-0, 0-30, 30-60, 60-90, and 90-120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey's P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*;  $\blacklozenge$  Significant difference from Baseline. P values shown.



**Figure S2. Beak Distance Lidocaine.** This variable was defined as the distance between the upper and lower beak of embryos. It was measured at **a** ED18 (n=15) and **b** ED18 w/Lido (n=5) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30-0, 0-30, 30-60, 60-90, and 90-120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey's P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ♦ Significant difference from baseline. P values shown.

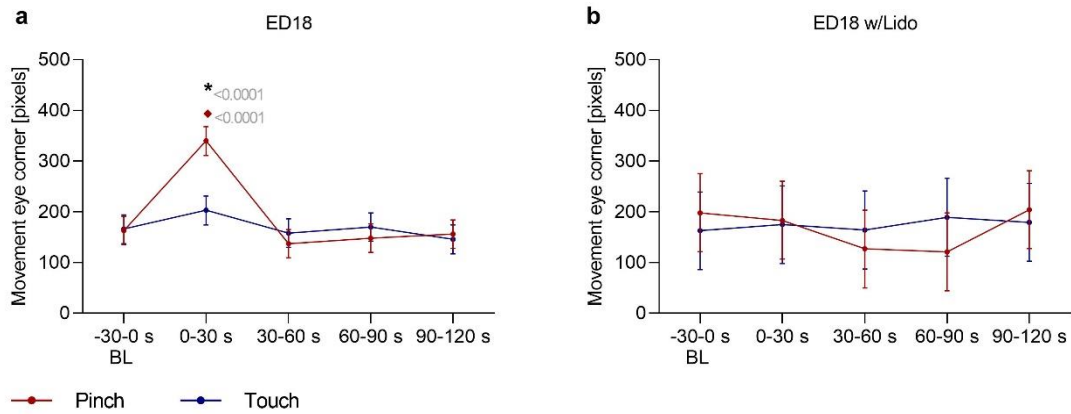


**Figure S3. Beak Angle.** This variable was defined as the angle between the beak corner, the upper and lower beak of embryos. It was measured at **a** ED13 (n=10), **b** ED14 (n=15), **c** ED15 (n=16), **d** ED16 (n=16), **e** ED17 (n=16), **f** ED18 (n=16) and **g** ED18 w/Lido (n=5) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30–0, 0–30, 30–60, 60–90, and 90–120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey’s P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ♦ Significant difference from baseline. P values shown.

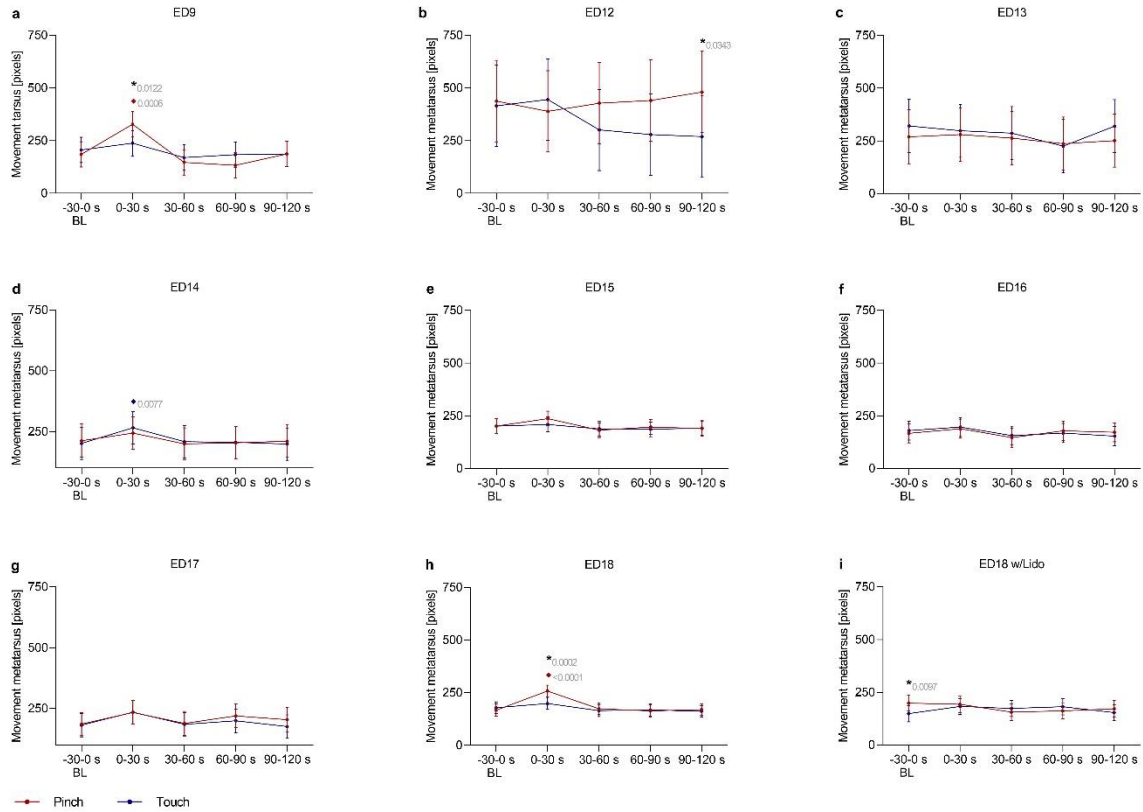


**Figure S4. Movement Eye corner ED9/ED12-14.** This variable was used to detect head movements of embryos at **a** ED9 (n=10), **b** ED12 (n=10), **c** ED13 (n=10) and **d** ED14 (n=15) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30-0, 0-30, 30-60, 60-90, and 90-120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey's P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ♦ Significant difference from baseline. P values shown.

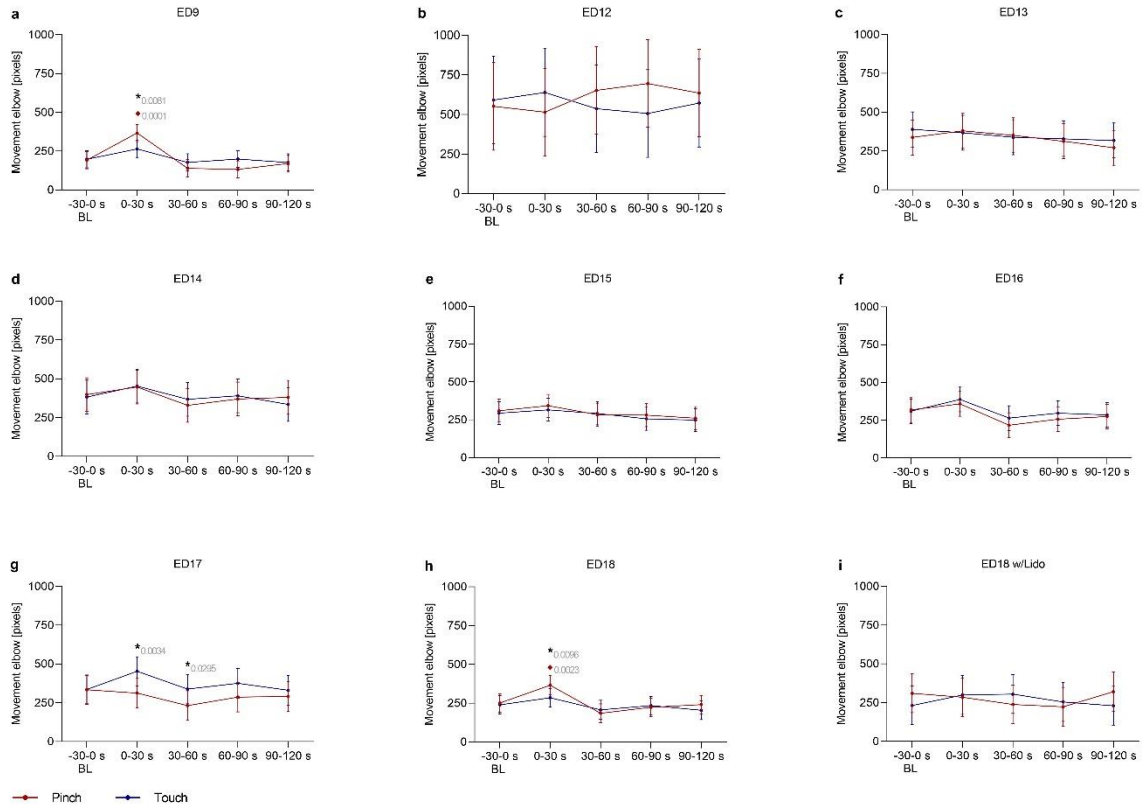




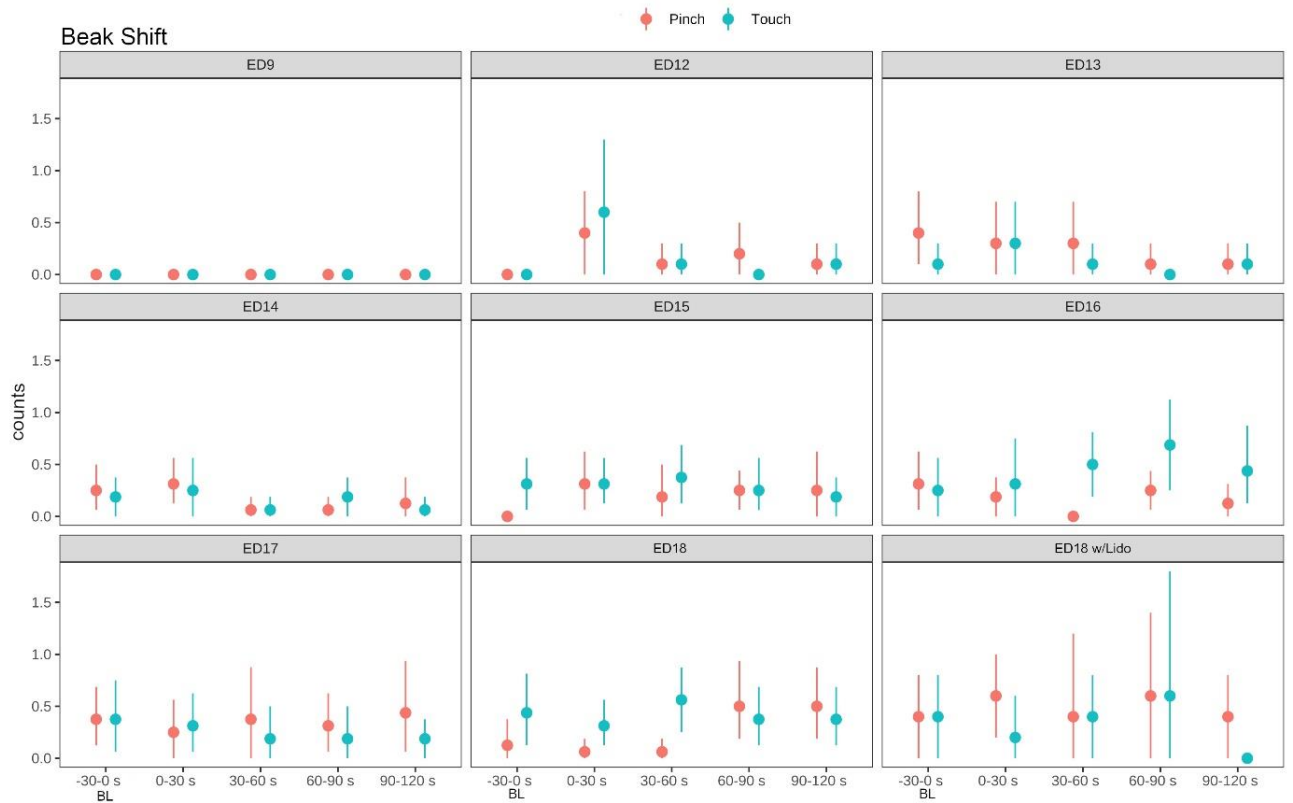
**Figure S5. Movement Eye corner Lidocaine.** This variable was used to detect head movements of embryos at **a** ED18 (n=15) and **b** ED18 w/Lido (n=5) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30–0, 0–30, 30–60, 60–90, and 90–120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey’s P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ♦ Significant difference from baseline. P values shown.



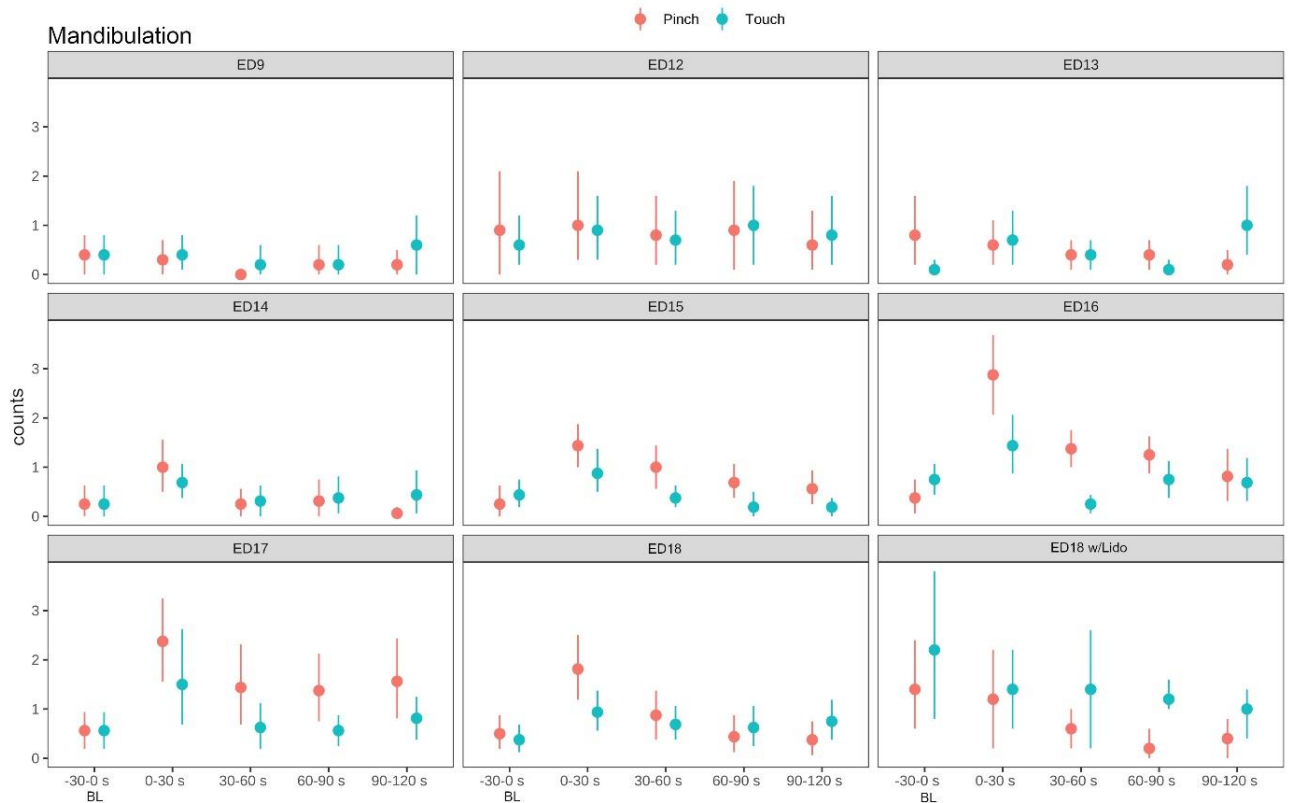
**Figure S6. Movement Metatarsus respectively Tarsus (ED9).** This variable was used to detect leg movements of embryos at **a** ED9 (n=10), **b** ED12 (n=10), **c** ED13 (n=10), **d** ED14 (n=15), **e** ED15 (n=16), **f** ED16 (n=16), **g** ED17 (n=16), **h** ED18 (n=16) and **i** ED18 w/Lido (n=5) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30-0, 0-30, 30-60, 60-90, and 90-120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey's P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*;  $\blacklozenge$  Significant difference from baseline. P values shown.



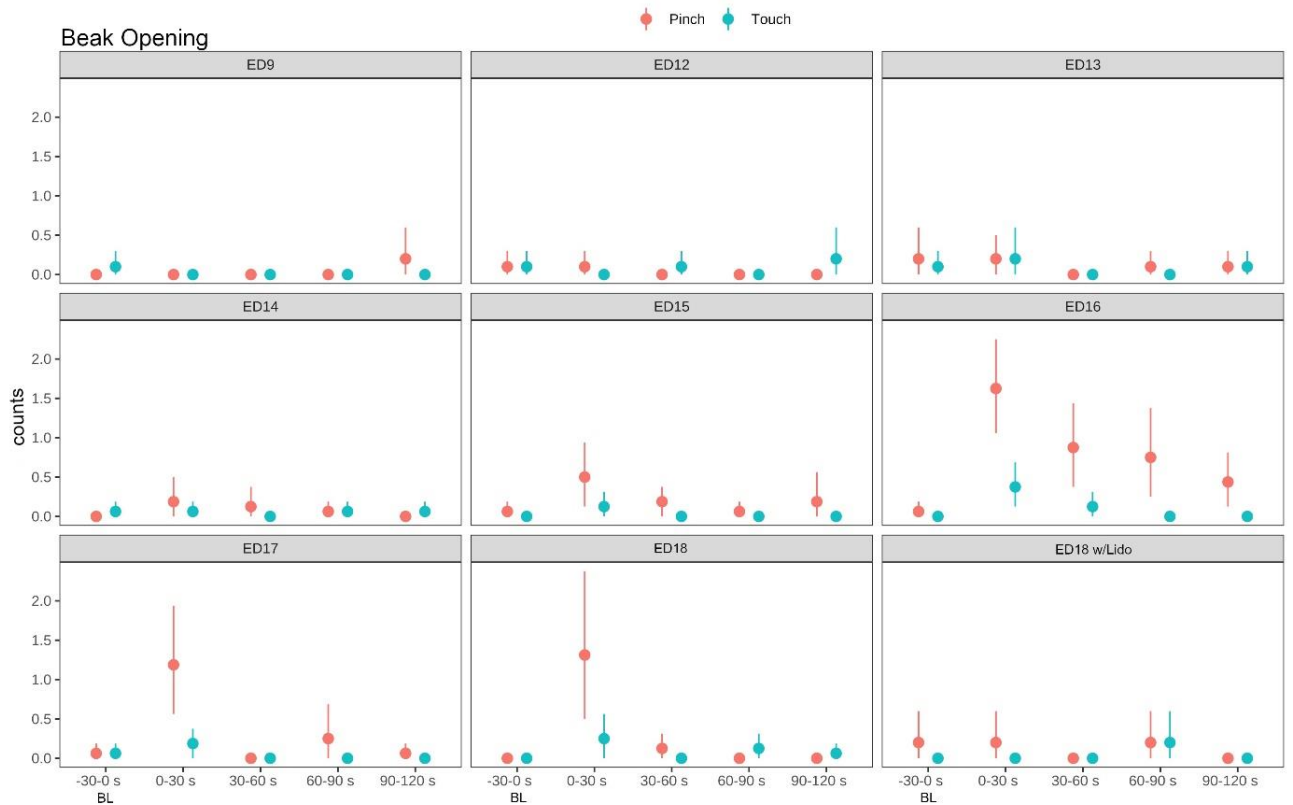
**Figure S7. Movement Elbow.** This variable was used to detect wing movements of embryos at **a** ED9 (n=10), **b** ED12 (n=10), **c** ED13 (n=10), **d** ED14 (n=15), **e** ED15 (n=16), **f** ED16 (n=16), **g** ED17 (n=16), **h** ED18 (n=16) and **i** ED18 w/Lido (n=5) before and after application of two stimuli (Touch and Pinch). The total distance in pixels across 30-second intervals (1500 frames) was evaluated. Plots show the estimated mean  $\pm$  95 % confidence intervals at the following 30-second intervals from Baseline (BL) to Post stimulation, with stimulation occurring at 0 s: -30–0, 0–30, 30–60, 60–90, and 90–120 seconds. Robust linear mixed effects were applied for all analysis. All contrasts (differences) between particular groups were assessed after model-fitting by the estimated marginal means with Tukey’s P value correction for multiple comparisons. *Touch*: blue; *Pinch*: red. \* Significant difference between *Pinch* and *Touch*; ◆ Significant difference from baseline. P values shown.



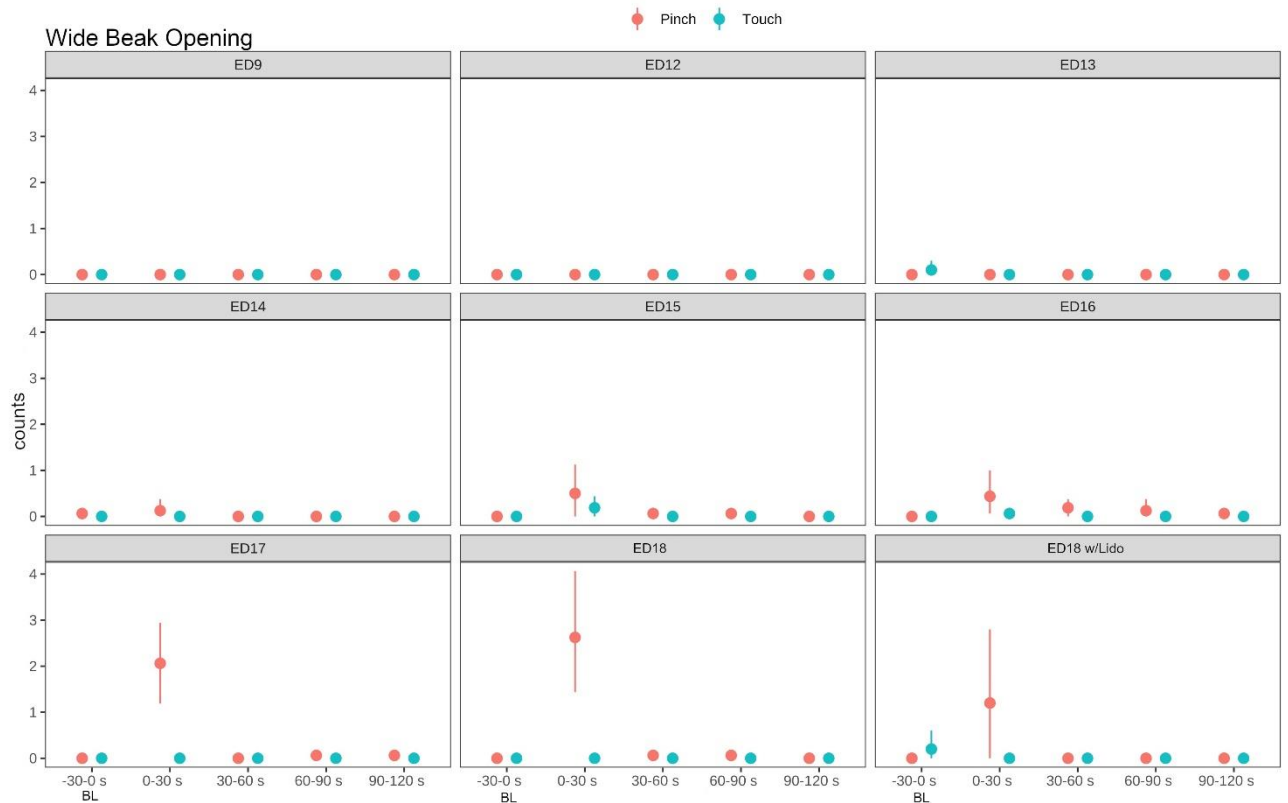
**Figure S8. Beak Shift.** The variable was used to detect the number of times (counts) embryos at ED9 (n=10), ED12 to ED13 (n=10), ED14 to ED18 (n=16) and ED18 w/ Lido (n=5) showed the behavior *Beak Shift* before and after stimulus (*Touch/Pinch*). A nonparametric bootstrap for obtaining confidence limits for the mean without assuming normality was used for the visualization of data.



**Figure S9. Mandibulation.** The variable was used to detect the number of times (counts) embryos at ED9 (n=10), ED12 to ED13 (n=10), ED14 to ED18 (n=16) and ED18 w/ Lido (n=5) showed the behavior *Mandibulation* before and after stimulus (*Touch/Pinch*). A nonparametric bootstrap for obtaining confidence limits for the mean without assuming normality was used for the visualization of data.



**Figure S10. Beak Opening.** The variable was used to detect the number of times (counts) embryos at ED9 (n=10), ED12 to ED13 (n=10), ED14 to ED18 (n=16) and ED18 w/ Lido (n=5) showed the behavior *Beak Opening* before and after stimulus (*Touch/Pinch*). A nonparametric bootstrap for obtaining confidence limits for the mean without assuming normality was used for the visualization of data.



**Figure S11. Wide Beak Opening.** The variable was used to detect the number of times (counts) embryos at ED9 (n=10), ED12 to ED13 (n=10), ED14 to ED18 (n=16) and ED18 w/ Lido (n=5) showed the behavior *Wide Beak Opening* before and after stimulus (*Touch/Pinch*). A nonparametric bootstrap for obtaining confidence limits for the mean without assuming normality was used for the visualization of data.

**Table S1.** Overview on the number of datasets from DLC included in the final analysis.

<b>ED18</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	15	15	15	15	14
	0-30 sec	15	15	15	15	14
	30-60 sec	15	15	15	15	14
	60-90 sec	15	15	15	15	14
	90-120 sec	15	15	15	15	14
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	15	15	15	15	14
	0-30 sec	15	15	15	15	14
	30-60 sec	15	15	15	15	14
	60-90 sec	15	15	15	15	14
	90-120 sec	15	15	15	15	14
<b>ED17</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	15	16	16	16	16
	30-60 sec	16	16	15	16	16
	60-90 sec	15	16	15	16	16
	90-120 sec	15	16	15	16	16
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	15	16	15	16	15
	30-60 sec	15	16	15	16	15
	60-90 sec	16	15	15	16	15
	90-120 sec	16	16	15	16	16
<b>ED16</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	16	16	16	16	16
	30-60 sec	16	16	16	16	16
	60-90 sec	16	16	16	16	16
	90-120 sec	15	16	16	16	16
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	16	16	16	16	16
	30-60 sec	16	16	16	16	16
	60-90 sec	16	16	16	16	16
	90-120 sec	16	16	16	16	16



<b>ED15</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	16	16	16	16	16
	30-60 sec	16	16	16	16	16
	60-90 sec	16	16	16	16	16
	90-120 sec	15	16	16	16	16
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	16	16	16	16	16
	0-30 sec	16	16	16	16	16
	30-60 sec	16	16	16	16	16
	60-90 sec	16	16	16	16	16
	90-120 sec	16	16	16	16	16
<b>ED14</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	15	15	15	15	13
	0-30 sec	15	15	15	15	13
	30-60 sec	15	15	15	15	13
	60-90 sec	15	15	15	15	13
	90-120 sec	15	15	15	15	13
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	15	15	15	15	13
	0-30 sec	15	15	15	15	13
	30-60 sec	15	15	15	15	13
	60-90 sec	15	15	15	15	13
	90-120 sec	15	15	15	15	13
<b>ED13</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	10	10	10	10	8
	0-30 sec	10	10	10	10	9
	30-60 sec	10	10	10	10	9
	60-90 sec	10	10	10	10	9
	90-120 sec	10	10	10	10	9
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	10	10	10	10	9
	0-30 sec	10	10	10	10	9
	30-60 sec	10	10	10	10	9
	60-90 sec	10	10	10	10	9
	90-120 sec	10	10	10	10	9

<b>ED12</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	10	10	9	10	8
	0-30 sec	10	10	9	10	8
	30-60 sec	10	10	9	10	8
	60-90 sec	10	10	9	10	8
	90-120 sec	10	10	9	10	8
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	10	10	9	10	8
	0-30 sec	10	10	9	10	8
	30-60 sec	10	10	9	10	8
	60-90 sec	10	10	9	10	8
	90-120 sec	10	10	9	10	8
<b>ED9</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Tarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	10	10	10	10	10
	0-30 sec	10	10	10	10	10
	30-60 sec	10	10	10	10	10
	60-90 sec	10	10	10	10	10
	90-120 sec	10	10	10	10	10
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	10	10	10	10	10
	0-30 sec	10	10	10	10	10
	30-60 sec	10	10	10	10	10
	60-90 sec	10	10	10	10	10
	90-120 sec	10	10	10	10	10
<b>ED18 w/ Lido</b>						
	<b>Time Interval</b>	<b>Beak angle</b>	<b>Beak distance</b>	<b>Elbow</b>	<b>Eye corner</b>	<b>Metatarsus</b>
<b>Touch</b>	-30-0 sec	5	5	5	5	5
	0-30 sec	5	5	5	5	5
	30-60 sec	5	5	5	5	5
	60-90 sec	5	5	5	5	5
	90-120 sec	5	5	5	5	5
<b>Pinch</b>	-30-0 sec	5	5	5	5	5
	0-30 sec	5	5	5	5	5
	30-60 sec	5	5	5	5	5
	60-90 sec	5	5	5	5	5
	90-120 sec	5	5	5	5	5

**Table S2.** Angabe zusätzlicher statistischer Werte der Abbildungen.

**Figure 2.** Distance Beak.

**a ED15**

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits				Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p						
time interval		emmean	LCL	UCL	time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	Pinch	70706	65699	75712	BL (-30-0s)	-903	-2954	1147	-0.863	0.3880
	Touch	71609	66602	76615	0-30s	4892	2841	6943	4.676	<.0001
0-30s	Pinch	78647	73640	83653	30-60s	3933	1882	5983	3.758	0.0002
	Touch	73755	68748	78761	60-90s	2436	385	4487	2.328	0.0199
30-60s	Pinch	76213	71207	81220	90-120s	1778	-272	3829	1.700	0.0892
	Touch	72281	67274	77287						
60-90s	Pinch	74504	69497	79510						
	Touch	72068	67061	77074						
90-120s	Pinch	74009	69003	79016						
	Touch	72231	67225	77237						

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio						Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio					
time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value	time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-7941.2	-10795	-5087	-7.590	<.0001	0-30s	-2146.0	-5000	708	-2.051	0.2418
30-60s	-5507.6	-8362	-2654	-5.264	<.0001	30-60s	-671.8	-3526	2182	-0.642	0.9681
60-90s	-3798.1	-6652	-944	-3.630	0.0026	60-90s	-459.0	-3313	2395	-0.439	0.9923
90-120s	-3303.7	-6158	-450	-3.158	0.0138	90-120s	-622.0	-3476	2232	-0.595	0.9759

**b ED16**

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits				Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p						
time interval		emmean	LCL	UCL	time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	Pinch	63861	58610	69113	BL (-30-0s)	589	-3808	4986	0.262	0.7930
	Touch	63273	58021	68524	0-30s	22824	18427	27221	10.174	<.0001
0-30s	Pinch	88858	83606	94109	30-60s	15921	11524	20318	7.097	<.0001
	Touch	66033	60782	71285	60-90s	12588	8191	16985	5.611	<.0001
30-60s	Pinch	78894	73642	84145	90-120s	8201	3804	12598	3.656	0.0003
	Touch	62972	57721	68224						
60-90s	Pinch	75057	69806	80309						
	Touch	62470	57218	67721						
90-120s	Pinch	70627	65376	75879						
	Touch	62427	57175	67679						

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio						Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio					
time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value	time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-24996.2	-31116	-18877	-11.142	<.0001	0-30s	-2760.8	-8880	3358	-1.231	0.7334
30-60s	-15032.2	-21152	-8913	-6.701	<.0001	30-60s	300.1	-5819	6419	0.134	0.9999
60-90s	-11196.0	-17315	-5077	-4.991	<.0001	60-90s	802.9	-5316	6922	0.358	0.9965
90-120s	-6766.1	-12885	-647	-3.016	0.0216	90-120s	845.8	-5274	6965	0.377	0.9957

**c ED17**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	63990	59391	68590
	Touch	66707	62107	71306
0-30s	Pinch	85232	80633	89831
	Touch	67082	62483	71682
30-60s	Pinch	78474	73874	83073
	Touch	66001	61402	70600
60-90s	Pinch	77007	72331	81682
	Touch	65477	60878	70076
90-120s	Pinch	75083	70484	79683
	Touch	66173	61574	70773

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-2716	-7105	1672	-1.213	0.2251
0-30s	18149	13761	22538	8.105	<.0001
30-60s	12473	8084	16861	5.570	<.0001
60-90s	11530	7061	15998	5.057	<.0001
90-120s	8910	4521	13299	3.979	0.0001

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-21241	-27349	-15133	-9.486	<.0001
30-60s	-14483	-20591	-8375	-6.468	<.0001
60-90s	-13016	-19235	-6797	-5.709	<.0001
90-120s	-11093	-17201	-4985	-4.954	<.0001

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-376	-6484	5732	-0.168	0.9998
30-60s	706	-5402	6814	0.315	0.9979
60-90s	1230	-4878	7338	0.549	0.9821
90-120s	533	-5575	6641	0.238	0.9993

**d ED18**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	63474	59299	67648
	Touch	68386	64212	72561
0-30s	Pinch	85363	81189	89538
	Touch	67462	63287	71637
30-60s	Pinch	72701	68527	76876
	Touch	66182	62007	70356
60-90s	Pinch	71317	67143	75492
	Touch	65683	61508	69857
90-120s	Pinch	70695	66520	74869
	Touch	65173	60999	69348

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-4913	-8055	-1770	-3.064	0.0022
0-30s	17902	14759	21044	11.165	<.0001
30-60s	6519	3377	9662	4.066	<.0001
60-90s	5635	2492	8777	3.514	0.0004
90-120s	5521	2379	8664	3.444	0.0006

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-21890	-26263	-17516	-13.653	<.0001
30-60s	-9228	-13601	-4854	-5.755	<.0001
60-90s	-7844	-12217	-3470	-4.892	<.0001
90-120s	-7221	-11594	-2847	-4.504	0.0001

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	924	-3449	5298	0.576	0.9785
30-60s	2204	-2169	6578	1.375	0.6439
60-90s	2703	-1670	7077	1.686	0.4425
90-120s	3213	-1161	7586	2.004	0.2640

Figure 3. Eye Corner Movement

**a ED15**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	145	117.1	174
	Touch	152	123.5	180
0-30s	Pinch	171	142.6	199
	Touch	161	132.7	189
30-60s	Pinch	129	100.6	157
	Touch	137	109.0	166
60-90s	Pinch	134	105.9	163
	Touch	124	95.6	152
90-120s	Pinch	137	108.7	165
	Touch	132	103.6	160

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-6.41	-29.6	16.8	-0.541	0.5883
0-30s	9.87	-13.3	33.1	0.833	0.4048
30-60s	-8.37	-31.6	14.8	-0.707	0.4797
60-90s	10.26	-12.9	33.5	0.867	0.3862
90-120s	5.05	-18.2	28.3	0.426	0.6699

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-25.45	-57.75	6.86	-2.149	0.1996
30-60s	16.46	-15.85	48.76	1.390	0.6344
60-90s	11.22	-21.08	43.53	0.948	0.8781
90-120s	8.42	-23.89	40.73	0.711	0.9541

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-9.17	-41.48	23.13	-0.774	0.9381
30-60s	14.50	-17.81	46.80	1.224	0.7374
60-90s	27.90	-4.41	60.20	2.356	0.1277
90-120s	19.88	-12.43	52.18	1.679	0.4473

**b ED16**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	154	121	187
	Touch	154	121	187
0-30s	Pinch	223	190	256
	Touch	190	157	223
30-60s	Pinch	149	116	182
	Touch	147	114	180
60-90s	Pinch	164	132	197
	Touch	153	120	186
90-120s	Pinch	145	113	178
	Touch	147	114	180

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	0.175	-31.01	31.4	0.011	0.9912
0-30s	32.986	1.81	64.2	2.073	0.0381
30-60s	1.334	-29.85	32.5	0.084	0.9332
60-90s	11.044	-20.14	42.2	0.694	0.4875
90-120s	-1.860	-33.04	29.3	-0.117	0.9069

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-68.93197	-112.327	-25.54	-4.333	0.0001
30-60s	5.51400	-37.881	48.91	0.347	0.9969
60-90s	-10.29130	-53.686	33.10	-0.647	0.9673
90-120s	8.70699	-34.688	52.10	0.547	0.9823

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-36.12152	-79.517	7.27	-2.271	0.1545
30-60s	6.67267	-36.723	50.07	0.419	0.9935
60-90s	0.57755	-42.818	43.97	0.036	1.0000
90-120s	6.67215	-36.723	50.07	0.419	0.9935

**c ED17**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	181	127	236
	Touch	199	145	254
0-30s	Pinch	331	276	386
	Touch	266	211	321
30-60s	Pinch	162	107	217
	Touch	193	139	248
60-90s	Pinch	195	140	250
	Touch	180	125	235
90-120s	Pinch	189	134	243
	Touch	179	125	234

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-18.00	-75.23	39.2	-0.616	0.5377
0-30s	65.01	7.78	122.2	2.226	0.0260
30-60s	-31.54	-88.78	25.7	-1.080	0.2801
60-90s	14.91	-42.33	72.1	0.510	0.6097
90-120s	9.02	-48.21	66.3	0.309	0.7573

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-149.538	-229.19	-69.9	-5.121	<.0001
30-60s	19.451	-60.21	99.1	0.666	0.9636
60-90s	-13.637	-93.29	66.0	-0.467	0.9903
90-120s	-7.218	-86.87	72.4	-0.247	0.9992

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-66.528	-146.18	13.1	-2.278	0.1519
30-60s	5.906	-73.75	85.6	0.202	0.9996
60-90s	19.266	-60.39	98.9	0.660	0.9649
90-120s	19.802	-59.85	99.5	0.678	0.9612

**d ED18**

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	163	135	191
	Touch	166	137	194
0-30s	Pinch	340	311	368
	Touch	203	174	231
30-60s	Pinch	137	109	165
	Touch	158	130	186
60-90s	Pinch	148	120	176
	Touch	170	142	198
90-120s	Pinch	156	128	184
	Touch	146	117	174

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-2.76	-36.5	31.0	-0.160	0.8728
0-30s	136.93	103.2	170.7	7.954	<.0001
30-60s	-20.90	-54.6	12.8	-1.214	0.2248
60-90s	-21.79	-55.5	12.0	-1.266	0.2056
90-120s	10.52	-23.2	44.3	0.611	0.5410

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-176.74	-223.70	-129.77	-10.265	<.0001
30-60s	25.72	-21.24	72.68	1.494	0.5664
60-90s	14.72	-32.25	61.68	0.855	0.9132
90-120s	6.76	-40.20	53.73	0.393	0.9950

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-37.05	-84.01	9.92	-2.152	0.1983
30-60s	7.58	-39.39	54.54	0.440	0.9922
60-90s	-4.32	-51.29	42.64	-0.251	0.9991
90-120s	20.04	-26.92	67.00	1.164	0.7719

Figure S1. Beak Distance ED13/ED14.

**a ED13**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	71066	66309	75823
	Touch	71409	66652	76166
0-30s	Pinch	71499	66743	76256
	Touch	72017	67260	76774
30-60s	Pinch	71120	66363	75877
	Touch	72028	67271	76785
60-90s	Pinch	70891	66134	75648
	Touch	71892	67135	76648
90-120s	Pinch	70929	66172	75686
	Touch	72008	67251	76765

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-343	-2791	2105	-0.275	0.7837
0-30s	-518	-2966	1930	-0.415	0.6785
30-60s	-909	-3357	1540	-0.727	0.4669
60-90s	-1000	-3448	1448	-0.801	0.4233
90-120s	-1079	-3527	1369	-0.864	0.3877

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-433.04	-3840	2974	-0.347	0.9969
30-60s	-53.23	-3461	3354	-0.043	1.0000
60-90s	175.14	-3232	3582	0.140	0.9999
90-120s	137.25	-3270	3545	0.110	1.0000

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-607.92	-4015	2799	-0.487	0.9886
30-60s	-619.01	-4026	2788	-0.496	0.9878
60-90s	-482.17	-3889	2925	-0.386	0.9953
90-120s	-598.70	-4006	2809	-0.479	0.9892

**b ED14**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	66422	63268	69576
	Touch	67489	64336	70643
0-30s	Pinch	67243	64090	70397
	Touch	68071	64917	71224
30-60s	Pinch	68135	64982	71289
	Touch	67994	64829	71159
60-90s	Pinch	68490	65336	71644
	Touch	67946	64792	71099
90-120s	Pinch	68394	65240	71548
	Touch	67826	64672	70980

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-1068	-2445	310	-1.519	0.1288
0-30s	-827	-2205	550	-1.177	0.2391
30-60s	141	-1261	1544	0.197	0.8436
60-90s	544	-833	1922	0.774	0.4388
90-120s	568	-809	1946	0.808	0.4189

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-821.6	-2739	1095.5	-1.169	0.7691
30-60s	-1713.5	-3631	203.6	-2.438	0.1053
60-90s	-2068.0	-3985	-150.9	-2.943	0.0270
90-120s	-1972.2	-3889	-55.1	-2.806	0.0402

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-581.5	-2499	1335.6	-0.827	0.9223
30-60s	-504.7	-2457	1447.5	-0.705	0.9554
60-90s	-456.4	-2373	1460.6	-0.649	0.9668
90-120s	-336.6	-2254	1580.4	-0.479	0.9893

Figure S2. Beak Distance Lidocaine.

**a ED18**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	63474	59299	67648
	Touch	68386	64212	72561
0-30s	Pinch	85363	81189	89538
	Touch	67462	63287	71637
30-60s	Pinch	72701	68527	76876
	Touch	66182	62007	70356
60-90s	Pinch	71317	67143	75492
	Touch	65683	61508	69857
90-120s	Pinch	70695	66520	74869
	Touch	65173	60999	69348

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-4913	-8055	-1770	-3.064	0.0022
0-30s	17902	14759	21044	11.165	<.0001
30-60s	6519	3377	9662	4.066	<.0001
60-90s	5635	2492	8777	3.514	0.0004
90-120s	5521	2379	8664	3.444	0.0006

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-21890	-26263	-17516	-13.653	<.0001
30-60s	-9228	-13601	-4854	-5.755	<.0001
60-90s	-7844	-12217	-3470	-4.892	<.0001
90-120s	-7221	-11594	-2847	-4.504	0.0001

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	924	-3449	5298	0.576	0.9785
30-60s	2204	-2169	6578	1.375	0.6439
60-90s	2703	-1670	7077	1.686	0.4425
90-120s	3213	-1161	7586	2.004	0.2640

**b ED18 w/Lido**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	64863	61816	67909
	Touch	68540	65494	71587
0-30s	Pinch	79520	76473	82566
	Touch	69449	66403	72495
30-60s	Pinch	70093	67047	73140
	Touch	67823	64776	70869
60-90s	Pinch	69640	66594	72686
	Touch	68330	65284	71376
90-120s	Pinch	68372	65326	71419
	Touch	68326	65279	71372

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-3677.7	-7210	-145	-2.040	0.0413
0-30s	10070.8	6538	13604	5.587	<.0001
30-60s	2271.0	-1262	5804	1.260	0.2077
60-90s	1310.0	-2223	4843	0.727	0.4674
90-120s	46.9	-3486	3580	0.026	0.9792

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-14656.91	-19574	-9740	-8.132	<.0001
30-60s	-5230.81	-10147	-314	-2.902	0.0304
60-90s	-4777.08	-9694	140	-2.650	0.0616
90-120s	-3509.79	-8426	1407	-1.947	0.2923

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-908.36	-5825	4008	-0.504	0.9870
30-60s	717.88	-4199	5635	0.398	0.9947
60-90s	210.62	-4706	5127	0.117	1.0000
90-120s	214.85	-4702	5132	0.119	1.0000



Figure S3. Beak Angle.

**a ED13**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	28737	25211	32263
	Touch	28737	25212	32263
0-30s	Pinch	29034	25508	32560
	Touch	28830	25304	32356
30-60s	Pinch	28911	25385	32437
	Touch	28914	25388	32440
60-90s	Pinch	28795	25269	32321
	Touch	28914	25388	32440
90-120s	Pinch	28754	25228	32280
	Touch	28812	25286	32338

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
BL (-30-0s)	-0.768	-828	827	-0.002	0.9985
0-30s	203.570	-624	1031	0.482	0.6296
30-60s	-3.492	-831	824	-0.008	0.9934
60-90s	-118.382	-946	709	-0.280	0.7791
90-120s	-57.164	-885	770	-0.135	0.8923

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-297.140	-1449	854	-0.704	0.9557
30-60s	-173.919	-1325	978	-0.412	0.9940
60-90s	-58.717	-1210	1093	-0.139	0.9999
90-120s	-17.748	-1169	1134	-0.042	1.0000

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-92.803	-1244	1059	-0.220	0.9995
30-60s	-176.643	-1328	975	-0.418	0.9936
60-90s	-176.332	-1328	975	-0.418	0.9936
90-120s	-74.145	-1226	1077	-0.176	0.9998

**b ED14**

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	24440	21617	27263
	Touch	24793	21977	27609
0-30s	Pinch	25062	22239	27885
	Touch	24861	22038	27684
30-60s	Pinch	24656	21840	27472
	Touch	24744	21921	27567
60-90s	Pinch	24651	21835	27467
	Touch	24650	21834	27466
90-120s	Pinch	24468	21652	27284
	Touch	24759	21943	27575

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
BL (-30-0s)	-353.1	-1413	707	-0.653	0.5140
0-30s	201.0	-874	1276	0.367	0.7139
30-60s	-88.4	-1148	971	-0.163	0.8701
60-90s	1.5	-1039	1042	0.003	0.9977
90-120s	-290.7	-1331	750	-0.547	0.5841

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-621.98	-2118	874	-1.134	0.7885
30-60s	-216.02	-1692	1260	-0.399	0.9947
60-90s	-211.26	-1687	1265	-0.390	0.9951
90-120s	-28.56	-1504	1447	-0.053	1.0000

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-67.86	-1544	1408	-0.125	0.9999
30-60s	48.64	-1426	1524	0.090	1.0000
60-90s	143.31	-1305	1592	0.270	0.9988
90-120s	33.81	-1415	1482	0.064	1.0000

c ED15

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	23475	21874	25075
	Touch	23324	21724	24924
0-30s	Pinch	26939	25339	28539
	Touch	24253	22653	25853
30-60s	Pinch	25367	23767	26967
	Touch	23484	21884	25085
60-90s	Pinch	24796	23195	26396
	Touch	23409	21809	25009
90-120s	Pinch	24588	22988	26188
	Touch	23489	21889	25089

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
BL (-30-0s)	151	-977.3	1279	0.262	0.7934
0-30s	2686	1558.2	3814	4.668	<.0001
30-60s	1883	755.0	3011	3.272	0.0011
60-90s	1387	258.6	2514	2.409	0.0160
90-120s	1099	-29.2	2227	1.909	0.0562

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-3464.37	-5034.21	-1895	-6.020	<.0001
30-60s	-1892.41	-3462.26	-323	-3.288	0.0089
60-90s	-1320.76	-2890.60	249	-2.295	0.1464
90-120s	-1113.11	-2682.95	457	-1.934	0.2991

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-928.86	-2498.70	641	-1.614	0.4883
30-60s	-160.17	-1730.01	1410	-0.278	0.9987
60-90s	-84.92	-1654.77	1485	-0.148	0.9999
90-120s	-165.05	-1734.89	1405	-0.287	0.9985

d ED16

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	18949	17409	20490
	Touch	18461	16920	20002
0-30s	Pinch	26351	24811	27892
	Touch	19296	17755	20836
30-60s	Pinch	23150	21609	24690
	Touch	18297	16756	19837
60-90s	Pinch	21982	20441	23523
	Touch	18176	16636	19717
90-120s	Pinch	20586	19046	22127
	Touch	18018	16451	19586

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
BL (-30-0s)	488	-1021	1998	0.634	0.5261
0-30s	7056	5546	8565	9.162	<.0001
30-60s	4853	3344	6363	6.302	<.0001
60-90s	3806	2296	5315	4.942	<.0001
90-120s	2568	1031	4105	3.275	0.0011

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-7402	-9503	-5301	-9.611	<.0001
30-60s	-4201	-6301	-2100	-5.454	<.0001
60-90s	-3033	-5133	-932	-3.938	0.0008
90-120s	-1637	-3738	464	-2.125	0.2091

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z.ratio	p.value
0-30s	-834	-2935	1266	-1.084	0.8151
30-60s	164	-1936	2265	0.213	0.9995
60-90s	285	-1816	2386	0.370	0.9960
90-120s	443	-1696	2582	0.565	0.9801

e ED17

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	18881	17349	20413
	Touch	19674	18142	21206
0-30s	Pinch	25019	23466	26572
	Touch	19805	18252	21358
30-60s	Pinch	23260	21727	24792
	Touch	19605	18052	21158
60-90s	Pinch	22633	21080	24186
	Touch	19380	17848	20913
90-120s	Pinch	22172	20619	23725
	Touch	19585	18052	21117

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-793	-2105	519	-1.185	0.2362
0-30s	5214	3859	6569	7.541	<.0001
30-60s	3654	2318	4991	5.361	<.0001
60-90s	3253	1917	4589	4.772	<.0001
90-120s	2588	1252	3924	3.796	0.0001

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-6138.3	-7998	-4278	-9.002	<.0001
30-60s	-4378.5	-6205	-2552	-6.540	<.0001
60-90s	-3752.2	-5612	-1893	-5.504	<.0001
90-120s	-3291.1	-5151	-1431	-4.828	<.0001

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-131.1	-1991	1729	-0.192	0.9997
30-60s	69.0	-1791	1929	0.101	1.0000
60-90s	293.8	-1532	2120	0.439	0.9923
90-120s	89.6	-1737	1916	0.134	0.9999

f ED18

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	17609	15697	19521
	Touch	19731	17819	21643
0-30s	Pinch	24280	22368	26192
	Touch	19498	17586	21410
30-60s	Pinch	20984	19072	22896
	Touch	19057	17145	20969
60-90s	Pinch	20480	18568	22392
	Touch	18833	16921	20745
90-120s	Pinch	20340	18428	22252
	Touch	18581	16669	20493

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-2122	-3177	-1067	-3.943	0.0001
0-30s	4783	3728	5837	8.886	<.0001
30-60s	1927	872	2982	3.579	0.0003
60-90s	1647	592	2701	3.059	0.0022
90-120s	1759	704	2814	3.268	0.0011

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-6672	-8140	-5204	-12.396	<.0001
30-60s	-3375	-4844	-1907	-6.271	<.0001
60-90s	-2871	-4339	-1403	-5.334	<.0001
90-120s	-2731	-4200	-1263	-5.075	<.0001

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	233	-1235	1701	0.433	0.9927
30-60s	673	-795	2142	1.251	0.7211
60-90s	898	-570	2366	1.668	0.4539
90-120s	1150	-319	2618	2.136	0.2048

g ED18 w/ Lido

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	17070	15837	18302
	Touch	18357	17124	19589
0-30s	Pinch	21318	20085	22551
	Touch	18524	17291	19756
30-60s	Pinch	18826	17593	20059
	Touch	18051	16819	19284
60-90s	Pinch	18611	17378	19844
	Touch	18236	17003	19469
90-120s	Pinch	18384	17151	19616
	Touch	18185	16952	19418

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-1287	-2424	-150	-2.219	0.0265
0-30s	2794	1657	3931	4.818	<.0001
30-60s	775	-362	1911	1.336	0.1816
60-90s	375	-762	1512	0.647	0.5179
90-120s	199	-938	1335	0.342	0.7321

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-4248.3	-5830	-2666.4	-7.326	<.0001
30-60s	-1756.6	-3339	-174.7	-3.029	0.0207
60-90s	-1541.3	-3123	40.6	-2.658	0.0604
90-120s	-1314.0	-2896	267.9	-2.266	0.1560

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-167.1	-1749	1414.8	-0.288	0.9985
30-60s	305.2	-1277	1887.1	0.526	0.9847
60-90s	120.7	-1461	1702.6	0.208	0.9996
90-120s	171.6	-1410	1753.5	0.296	0.9983

Figure S4. Movement Eye corner ED9/ED12-14.

a ED9

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	146	111.9	181
	Touch	150	115.3	184
0-30s	Pinch	177	142.1	211
	Touch	161	126.3	195
30-60s	Pinch	137	102.4	171
	Touch	145	110.1	179
60-90s	Pinch	131	96.1	165
	Touch	147	112.6	182
90-120s	Pinch	144	109.1	178
	Touch	145	110.4	179

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-3.45	-24.26	17.35	-0.325	0.7449
0-30s	15.74	-5.07	36.55	1.482	0.1382
30-60s	-7.67	-28.48	13.14	-0.723	0.4699
60-90s	-16.48	-37.29	4.33	-1.552	0.1206
90-120s	-1.31	-22.12	19.50	-0.123	0.9020

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-30.201	-59.16	-1.24	-2.845	0.0360
30-60s	9.499	-19.46	38.46	0.895	0.8990
60-90s	15.750	-13.21	44.71	1.483	0.5733
90-120s	2.824	-26.14	31.78	0.266	0.9989

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-11.009	-39.97	17.95	-1.037	0.8383
30-60s	5.282	-23.68	34.24	0.497	0.9876
60-90s	2.724	-26.24	31.68	0.257	0.9990
90-120s	4.971	-23.99	33.93	0.468	0.9902

b ED12

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	168	118.5	218
	Touch	171	121.2	221
0-30s	Pinch	194	144.3	244
	Touch	178	128.6	228
30-60s	Pinch	188	138.7	238
	Touch	146	95.9	195
60-90s	Pinch	178	128.6	228
	Touch	151	100.9	200
90-120s	Pinch	161	111.3	211
	Touch	138	88.2	188

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-2.7	-42.89	37.5	-0.132	0.8951
0-30s	15.7	-24.49	55.9	0.766	0.4439
30-60s	42.7	2.53	82.9	2.083	0.0372
60-90s	27.7	-12.51	67.9	1.350	0.1771
90-120s	23.0	-17.14	63.2	1.124	0.2610

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-25.77	-81.7	30.2	-1.257	0.7177
30-60s	-20.12	-76.0	35.8	-0.981	0.8638
60-90s	-10.02	-65.9	45.9	-0.489	0.9884
90-120s	7.27	-48.7	63.2	0.355	0.9966

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-7.37	-63.3	48.6	-0.359	0.9964
30-60s	25.30	-30.6	81.2	1.234	0.7314
60-90s	20.36	-35.6	76.3	0.993	0.8587
90-120s	33.03	-22.9	89.0	1.611	0.4904

c ED13

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	144	106.9	180
	Touch	155	118.0	191
0-30s	Pinch	201	164.4	238
	Touch	158	121.0	194
30-60s	Pinch	144	107.6	181
	Touch	140	103.1	176
60-90s	Pinch	139	102.5	176
	Touch	120	83.0	156
90-120s	Pinch	125	88.3	162
	Touch	142	105.4	179

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-11.10	-49.14	26.9	-0.572	0.5674
0-30s	43.40	5.35	81.4	2.236	0.0254
30-60s	4.47	-33.57	42.5	0.230	0.8179
60-90s	19.49	-18.55	57.5	1.004	0.3153
90-120s	-17.06	-55.10	21.0	-0.879	0.3795

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-57.451	-110.40	-4.5	-2.960	0.0256
30-60s	-0.635	-53.58	52.3	-0.033	1.0000
60-90s	4.463	-48.48	57.4	0.230	0.9994
90-120s	18.597	-34.35	71.5	0.958	0.8738

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-2.954	-55.90	50.0	-0.152	0.9999
30-60s	14.935	-38.01	67.9	0.769	0.9394
60-90s	35.055	-17.89	88.0	1.806	0.3700
90-120s	12.640	-40.31	65.6	0.651	0.9665

d ED14

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	152	112.0	191
	Touch	142	102.5	182
0-30s	Pinch	196	156.6	236
	Touch	190	150.5	230
30-60s	Pinch	122	82.4	162
	Touch	156	116.3	196
60-90s	Pinch	137	97.5	177
	Touch	149	109.6	189
90-120s	Pinch	140	100.3	180
	Touch	133	93.4	173

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	9.52	-18.4	37.48	0.667	0.5046
0-30s	6.10	-21.9	34.06	0.427	0.6691
30-60s	-33.90	-61.9	-5.94	-2.376	0.0175
60-90s	-12.04	-40.0	15.92	-0.844	0.3986
90-120s	6.90	-21.1	34.86	0.484	0.6287

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-44.58	-83.49	-5.66	-3.125	0.0153
30-60s	29.59	-9.33	68.50	2.074	0.2315
60-90s	14.48	-24.43	53.40	1.015	0.8485
90-120s	11.73	-27.19	50.65	0.822	0.9239

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-48.00	-86.92	-9.08	-3.364	0.0069
30-60s	-13.83	-52.75	25.08	-0.970	0.8689
60-90s	-7.08	-45.99	31.84	-0.496	0.9878
90-120s	9.11	-29.81	48.03	0.639	0.9688

Figure S5. Movement Eye corner Lidocaine.

a ED18

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	163	135	191
	Touch	166	137	194
0-30s	Pinch	340	311	368
	Touch	203	174	231
30-60s	Pinch	137	109	165
	Touch	158	130	186
60-90s	Pinch	148	120	176
	Touch	170	142	198
90-120s	Pinch	156	128	184
	Touch	146	117	174

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-2.76	-36.5	31.0	-0.160	0.8728
0-30s	136.93	103.2	170.7	7.954	<.0001
30-60s	-20.90	-54.6	12.8	-1.214	0.2248
60-90s	-21.79	-55.5	12.0	-1.266	0.2056
90-120s	10.52	-23.2	44.3	0.611	0.5410

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-176.74	-223.70	-129.77	-10.265	<.0001
30-60s	25.72	-21.24	72.68	1.494	0.5664
60-90s	14.72	-32.25	61.68	0.855	0.9132
90-120s	6.76	-40.20	53.73	0.393	0.9950

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-37.05	-84.01	9.92	-2.152	0.1983
30-60s	7.58	-39.39	54.54	0.440	0.9922
60-90s	-4.32	-51.29	42.64	-0.251	0.9991
90-120s	20.04	-26.92	67.00	1.164	0.7719

b ED18 w/ Lido

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	198	121.1	275
	Touch	163	85.9	239
0-30s	Pinch	183	106.5	260
	Touch	175	97.8	251
30-60s	Pinch	127	49.8	203
	Touch	164	87.0	241
60-90s	Pinch	121	44.5	198
	Touch	189	112.5	266
90-120s	Pinch	204	127.3	281
	Touch	179	102.4	256

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	35.20	-50.0	120.4	0.809	0.4183
0-30s	8.64	-76.6	93.9	0.199	0.8425
30-60s	-37.16	-122.4	48.1	-0.854	0.3929
60-90s	-67.95	-153.2	17.3	-1.562	0.1182
90-120s	24.96	-60.3	110.2	0.574	0.5660

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	14.62	-104.0	133.2	0.336	0.9973
30-60s	71.29	-47.3	189.9	1.639	0.4721
60-90s	76.59	-42.0	195.2	1.761	0.3965
90-120s	-6.23	-124.9	112.4	-0.143	0.9999

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-11.94	-130.6	106.7	-0.275	0.9988
30-60s	-1.07	-119.7	117.6	-0.025	1.0000
60-90s	-26.56	-145.2	92.1	-0.611	0.9735
90-120s	-16.47	-135.1	102.2	-0.379	0.9956

Figure S6. Movement Metatarsus respectively Tarsus (ED9).

a ED9

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	185	124.9	245
	Touch	206	146.5	266
0-30s	Pinch	328	268.2	388
	Touch	238	178.3	298
30-60s	Pinch	147	87.3	207
	Touch	170	110.3	230
60-90s	Pinch	133	73.5	193
	Touch	184	124.3	244
90-120s	Pinch	187	127.5	247
	Touch	187	127.3	247

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-21.582	-91.9	48.7	-0.602	0.5472
0-30s	89.859	19.6	160.1	2.506	0.0122
30-60s	-23.010	-93.3	47.3	-0.642	0.5211
60-90s	-50.820	-121.1	19.5	-1.417	0.1564
90-120s	0.259	-70.0	70.5	0.007	0.9942

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-143.25	-241.1	-45.4	-3.995	0.0006
30-60s	37.64	-60.2	135.5	1.050	0.8320
60-90s	51.43	-46.4	149.2	1.434	0.6054
90-120s	-2.61	-100.4	95.2	-0.073	1.0000

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-31.81	-129.6	66.0	-0.887	0.9018
30-60s	36.22	-61.6	134.0	1.010	0.8509
60-90s	22.19	-75.6	120.0	0.619	0.9721
90-120s	19.23	-78.6	117.0	0.536	0.9836

b ED12

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	438	244.8	631
	Touch	415	222.3	608
0-30s	Pinch	389	196.4	582
	Touch	445	252.2	638
30-60s	Pinch	428	234.6	621
	Touch	301	108.0	494
60-90s	Pinch	441	248.0	634
	Touch	279	86.3	472
90-120s	Pinch	481	288.0	674
	Touch	269	76.1	462

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	22.5	-173.7	219	0.225	0.8219
0-30s	-55.8	-251.9	140	-0.557	0.5774
30-60s	126.6	-69.6	323	1.265	0.2060
60-90s	161.7	-34.5	358	1.615	0.1062
90-120s	211.9	15.7	408	2.117	0.0343

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	48.41	-224.6	321	0.484	0.9889
30-60s	10.20	-262.8	283	0.102	1.0000
60-90s	-3.18	-276.2	270	-0.032	1.0000
90-120s	-43.14	-316.2	230	-0.431	0.9928

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-29.88	-302.9	243	-0.299	0.9983
30-60s	114.27	-158.8	387	1.142	0.7843
60-90s	136.00	-137.0	409	1.359	0.6542
90-120s	146.24	-126.8	419	1.461	0.5880

c ED13

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	269	141.7	397
	Touch	321	194.7	447
0-30s	Pinch	280	153.9	406
	Touch	298	171.7	423
30-60s	Pinch	263	137.4	389
	Touch	287	161.6	413
60-90s	Pinch	237	111.0	363
	Touch	225	99.3	351
90-120s	Pinch	251	125.5	377
	Touch	320	194.1	446

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-51.3	-134.5	31.9	-1.208	0.2270
0-30s	-17.8	-98.3	62.7	-0.432	0.6654
30-60s	-24.2	-104.7	56.3	-0.590	0.5554
60-90s	11.8	-68.7	92.3	0.287	0.7743
90-120s	-68.5	-149.0	11.9	-1.669	0.0951

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-10.453	-126.3	105.4	-0.246	0.9992
30-60s	6.079	-109.8	121.9	0.143	0.9999
60-90s	32.414	-83.4	148.3	0.763	0.9411
90-120s	17.903	-97.9	133.7	0.422	0.9934

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	23.096	-88.9	135.1	0.562	0.9804
30-60s	33.171	-78.9	145.2	0.808	0.9284
60-90s	95.498	-16.5	207.5	2.325	0.1368
90-120s	0.661	-111.4	112.7	0.016	1.0000



d ED14

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	213	146	281
	Touch	202	136	269
0-30s	Pinch	244	177	311
	Touch	266	199	333
30-60s	Pinch	200	133	266
	Touch	209	142	275
60-90s	Pinch	204	137	271
	Touch	206	139	273
90-120s	Pinch	211	144	279
	Touch	199	132	265

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	11.01	-27.2	49.2	0.564	0.5726
0-30s	-22.18	-59.6	15.2	-1.162	0.2454
30-60s	-9.06	-46.5	28.4	-0.475	0.6351
60-90s	-2.24	-40.5	36.0	-0.115	0.9084
90-120s	12.76	-25.5	51.0	0.654	0.5130

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-30.43	-83.65	22.8	-1.560	0.5233
30-60s	13.79	-39.43	67.0	0.707	0.9551
60-90s	9.74	-44.31	63.8	0.492	0.9882
90-120s	1.98	-52.08	56.0	0.100	1.0000

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-63.62	-115.71	-11.5	-3.332	0.0077
30-60s	-6.29	-58.37	45.8	-0.329	0.9975
60-90s	-3.51	-55.60	48.6	-0.184	0.9997
90-120s	3.73	-48.36	55.8	0.195	0.9997

e ED15

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	201	166	236
	Touch	201	166	236
0-30s	Pinch	237	202	272
	Touch	209	174	244
30-60s	Pinch	182	147	217
	Touch	188	153	223
60-90s	Pinch	197	162	232
	Touch	186	151	221
90-120s	Pinch	190	155	225
	Touch	192	157	227

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-0.525	-31.34	30.3	-0.033	0.9734
0-30s	27.979	-2.84	58.8	1.780	0.0751
30-60s	-6.394	-37.21	24.4	-0.407	0.6842
60-90s	10.782	-20.03	41.6	0.686	0.4928
90-120s	-2.249	-33.06	28.6	-0.143	0.8862

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-36.28	-79.16	6.61	-2.307	0.1424
30-60s	18.85	-24.03	61.74	1.199	0.7519
60-90s	3.48	-39.40	46.37	0.221	0.9995
90-120s	10.61	-32.27	53.50	0.675	0.9618

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-7.77	-50.66	35.11	-0.494	0.9879
30-60s	12.98	-29.90	55.87	0.826	0.9227
60-90s	14.79	-28.10	57.67	0.941	0.8810
90-120s	8.89	-34.00	51.77	0.565	0.9800

f ED16

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	167	122	212
	Touch	180	135	225
0-30s	Pinch	189	144	234
	Touch	197	152	242
30-60s	Pinch	147	101	192
	Touch	156	111	201
60-90s	Pinch	179	134	224
	Touch	168	123	214
90-120s	Pinch	172	127	217
	Touch	154	109	199

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-12.66	-45.9	20.6	-0.747	0.4553
0-30s	-7.97	-41.2	25.3	-0.470	0.6386
30-60s	-9.36	-42.6	23.9	-0.552	0.5810
60-90s	10.70	-22.5	43.9	0.631	0.5282
90-120s	18.20	-15.1	51.4	1.073	0.2834

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-21.67	-67.94	24.6	-1.277	0.7052
30-60s	20.73	-25.54	67.0	1.222	0.7385
60-90s	-11.91	-58.18	34.4	-0.702	0.9561
90-120s	-4.75	-51.02	41.5	-0.280	0.9987

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-16.97	-63.25	29.3	-1.001	0.8552
30-60s	24.03	-22.24	70.3	1.417	0.6168
60-90s	11.45	-34.82	57.7	0.675	0.9618
90-120s	26.11	-20.16	72.4	1.539	0.5367

g ED17

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	186	138	234
	Touch	182	134	230
0-30s	Pinch	234	185	283
	Touch	235	187	284
30-60s	Pinch	189	140	238
	Touch	185	137	233
60-90s	Pinch	220	171	269
	Touch	200	151	248
90-120s	Pinch	204	155	254
	Touch	176	128	224

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	4.22	-39.5	48.0	0.189	0.8500
0-30s	-1.11	-45.7	43.5	-0.049	0.9612
30-60s	4.02	-40.5	48.6	0.177	0.8597
60-90s	20.03	-24.5	64.6	0.881	0.3783
90-120s	28.38	-16.2	72.9	1.248	0.2121

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-48.21	-110.24	13.82	-2.120	0.2114
30-60s	-2.77	-64.80	59.26	-0.122	1.0000
60-90s	-33.55	-95.58	28.48	-1.475	0.5786
90-120s	-18.39	-80.42	43.64	-0.809	0.9281

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-53.54	-114.41	7.34	-2.399	0.1155
30-60s	-2.97	-63.84	57.90	-0.133	0.9999
60-90s	-17.73	-78.61	43.14	-0.795	0.9323
90-120s	5.77	-55.11	66.64	0.258	0.9990

h ED18

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	167	139	196
	Touch	179	151	207
0-30s	Pinch	258	230	286
	Touch	199	171	228
30-60s	Pinch	174	146	202
	Touch	165	137	193
60-90s	Pinch	164	136	192
	Touch	169	140	197
90-120s	Pinch	170	142	198
	Touch	162	134	190

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-11.48	-41.8	18.8	-0.742	0.4579
0-30s	58.23	27.9	88.5	3.765	0.0002
30-60s	8.58	-21.7	38.9	0.555	0.5792
60-90s	-4.31	-34.6	26.0	-0.279	0.7806
90-120s	7.61	-22.7	37.9	0.492	0.6227

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-90.23	-132.42	-48.0	-5.834	<.0001
30-60s	-6.19	-48.38	36.0	-0.400	0.9946
60-90s	3.22	-38.97	45.4	0.208	0.9996
90-120s	-2.41	-44.60	39.8	-0.156	0.9999

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-20.51	-62.70	21.7	-1.326	0.6748
30-60s	13.87	-28.32	56.1	0.897	0.8982
60-90s	10.39	-31.80	52.6	0.672	0.9625
90-120s	16.68	-25.51	58.9	1.078	0.8178

i ED18 w/ Lido

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	199	161	238
	Touch	149	110	187
0-30s	Pinch	193	154	231
	Touch	183	144	221
30-60s	Pinch	156	117	194
	Touch	174	135	212
60-90s	Pinch	162	124	201
	Touch	182	143	220
90-120s	Pinch	172	134	211
	Touch	154	115	192

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	50.7	12.3	89.0	2.588	0.0097
0-30s	10.3	-28.0	48.7	0.527	0.5978
30-60s	-17.9	-56.3	20.4	-0.917	0.3592
60-90s	-19.3	-57.6	19.1	-0.984	0.3250
90-120s	18.2	-20.1	56.6	0.931	0.3517

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	6.50	-46.89	59.9	0.332	0.9974
30-60s	43.81	-9.58	97.2	2.238	0.1656
60-90s	37.11	-16.29	90.5	1.896	0.3195
90-120s	27.33	-26.06	80.7	1.396	0.6300

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-33.83	-87.22	19.6	-1.728	0.4166
30-60s	-24.79	-78.19	28.6	-1.267	0.7118
60-90s	-32.81	-86.21	20.6	-1.676	0.4487
90-120s	-5.09	-58.49	48.3	-0.260	0.9990

Figure S7. Elbow Movement.

a ED9

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	192	136.5	247
	Touch	198	142.5	253
0-30s	Pinch	367	311.7	422
	Touch	264	208.9	319
30-60s	Pinch	139	84.3	195
	Touch	178	122.8	233
60-90s	Pinch	133	77.9	188
	Touch	199	144.0	254
90-120s	Pinch	170	114.9	225
	Touch	177	122.3	233

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-5.95	-82.1	70.23	-0.153	0.8783
0-30s	102.85	26.7	179.03	2.646	0.0081
30-60s	-38.44	-114.6	37.73	-0.989	0.3226
60-90s	-66.18	-142.4	9.99	-1.703	0.0886
90-120s	-7.35	-83.5	68.82	-0.189	0.8499

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-175.217	-281.2	-69.2	-4.508	0.0001
30-60s	52.174	-53.8	158.2	1.342	0.6646
60-90s	58.635	-47.4	164.7	1.509	0.5568
90-120s	21.559	-84.5	127.6	0.555	0.9814

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-66.415	-172.4	39.6	-1.709	0.4284
30-60s	19.682	-86.3	125.7	0.506	0.9868
60-90s	-1.599	-107.6	104.4	-0.041	1.0000
90-120s	20.156	-85.9	126.2	0.519	0.9855

b ED12

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	552	275	829
	Touch	592	315	869
0-30s	Pinch	515	238	792
	Touch	639	362	916
30-60s	Pinch	653	376	930
	Touch	537	260	814
60-90s	Pinch	696	420	973
	Touch	507	230	783
90-120s	Pinch	636	359	912
	Touch	573	296	850

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-40.2	-241.3	160.8	-0.392	0.6949
0-30s	-124.4	-325.4	76.7	-1.212	0.2253
30-60s	115.7	-85.3	316.7	1.128	0.2593
60-90s	189.8	-11.3	390.8	1.850	0.0643
90-120s	62.7	-138.3	263.8	0.612	0.5408

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	36.8	-243	316.5	0.358	0.9965
30-60s	-101.2	-381	178.5	-0.987	0.8613
60-90s	-144.7	-424	135.1	-1.410	0.6209
90-120s	-83.8	-364	196.0	-0.817	0.9256

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-47.4	-327	232.4	-0.462	0.9907
30-60s	54.7	-225	334.5	0.533	0.9839
60-90s	85.3	-194	365.1	0.832	0.9208
90-120s	19.2	-261	299.0	0.187	0.9997

c ED13

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	337	224	449
	Touch	389	276	502
0-30s	Pinch	380	267	492
	Touch	367	255	480
30-60s	Pinch	351	238	464
	Touch	338	226	451
60-90s	Pinch	312	199	425
	Touch	328	215	441
90-120s	Pinch	271	158	383
	Touch	317	205	430

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-52.1	-136.6	32.4	-1.208	0.2269
0-30s	12.3	-72.2	96.8	0.285	0.7757
30-60s	12.8	-71.7	97.3	0.298	0.7660
60-90s	-15.8	-100.3	68.7	-0.365	0.7148
90-120s	-46.8	-131.3	37.7	-1.085	0.2781

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-42.8	-160.42	74.8	-0.993	0.8586
30-60s	-14.4	-131.98	103.2	-0.333	0.9973
60-90s	24.6	-93.02	142.2	0.570	0.9794
90-120s	66.2	-51.41	183.8	1.535	0.5393

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	21.6	-96.04	139.2	0.500	0.9874
30-60s	50.6	-67.05	168.2	1.173	0.7671
60-90s	60.9	-56.67	178.5	1.413	0.6190
90-120s	71.5	-46.07	189.1	1.659	0.4595

d ED14

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	398	289	507
	Touch	382	273	491
0-30s	Pinch	447	338	556
	Touch	453	344	562
30-60s	Pinch	329	220	438
	Touch	368	259	477
60-90s	Pinch	370	261	479
	Touch	391	282	500
90-120s	Pinch	381	272	490
	Touch	335	226	444

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	16.29	-53.0	85.6	0.461	0.6451
0-30s	-5.64	-75.0	63.7	-0.159	0.8733
30-60s	-38.85	-108.2	30.5	-1.098	0.2721
60-90s	-20.32	-89.7	49.0	-0.574	0.5657
90-120s	45.85	-23.5	115.2	1.296	0.1950

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-48.72	-145.2	47.8	-1.377	0.6424
30-60s	69.38	-27.1	165.9	1.961	0.2852
60-90s	27.95	-68.5	124.4	0.790	0.9336
90-120s	17.24	-79.3	113.7	0.487	0.9886

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-70.65	-167.1	25.8	-1.997	0.2673
30-60s	14.24	-82.3	110.7	0.402	0.9945
60-90s	-8.67	-105.2	87.8	-0.245	0.9992
90-120s	46.80	-49.7	143.3	1.323	0.6770

e ED15

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	310	234	386
	Touch	294	219	370
0-30s	Pinch	343	267	418
	Touch	316	241	392
30-60s	Pinch	284	209	360
	Touch	292	217	368
60-90s	Pinch	281	205	357
	Touch	257	181	332
90-120s	Pinch	261	186	337
	Touch	248	173	324

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	15.48	-49.6	80.6	0.466	0.6412
0-30s	26.40	-38.7	91.5	0.795	0.4269
30-60s	-7.86	-73.0	57.3	-0.237	0.8129
60-90s	24.32	-40.8	89.4	0.732	0.4642
90-120s	12.88	-52.2	78.0	0.388	0.6983

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-32.81	-123.45	57.8	-0.987	0.8611
30-60s	25.68	-64.96	116.3	0.773	0.9385
60-90s	28.89	-61.75	119.5	0.869	0.9081
90-120s	48.67	-41.97	139.3	1.465	0.5856

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-21.90	-112.54	68.7	-0.659	0.9650
30-60s	2.33	-88.31	93.0	0.070	1.0000
60-90s	37.73	-52.91	128.4	1.135	0.7877
90-120s	46.06	-44.58	136.7	1.386	0.6365

f ED16

Table 1 Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	318	236	399
	Touch	310	228	391
0-30s	Pinch	358	276	440
	Touch	387	306	469
30-60s	Pinch	217	136	299
	Touch	264	183	346
60-90s	Pinch	257	175	339
	Touch	297	215	378
90-120s	Pinch	274	193	356
	Touch	285	204	367

Table 2 Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	7.92	-65.9	81.7	0.210	0.8334
0-30s	-29.39	-103.2	44.4	-0.781	0.4349
30-60s	-47.07	-120.8	26.7	-1.251	0.2111
60-90s	-39.67	-113.4	34.1	-1.054	0.2919
90-120s	-11.06	-84.8	62.7	-0.294	0.7690

Table 3 Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-40.3	-142.931	62.4	-1.070	0.8222
30-60s	100.4	-2.301	203.0	2.667	0.0590
60-90s	60.6	-42.045	163.3	1.611	0.4904
90-120s	43.4	-59.311	146.0	1.152	0.7786

Table 4 Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-77.6	-180.238	25.1	-2.061	0.2373
30-60s	45.4	-57.290	148.1	1.206	0.7481
60-90s	13.0	-89.630	115.7	0.347	0.9969
90-120s	24.4	-78.283	127.1	0.648	0.9671

g ED17

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	334	241	427
	Touch	336	243	429
0-30s	Pinch	312	217	407
	Touch	453	360	546
30-60s	Pinch	232	137	327
	Touch	338	243	433
60-90s	Pinch	287	192	382
	Touch	376	281	471
90-120s	Pinch	291	196	386
	Touch	331	234	427

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	-1.83	-94.3	90.68	-0.039	0.9691
0-30s	-140.84	-235.1	-46.58	-2.929	0.0034
30-60s	-106.61	-202.6	-10.63	-2.177	0.0295
60-90s	-89.50	-185.5	6.48	-1.828	0.0676
90-120s	-39.25	-137.1	58.62	-0.786	0.4319

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	22.04	-109.1	153.2	0.458	0.9909
30-60s	102.48	-28.7	233.7	2.131	0.2069
60-90s	47.24	-83.9	178.4	0.982	0.8634
90-120s	42.83	-88.3	174.0	0.891	0.9005

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-116.97	-245.7	11.8	-2.478	0.0956
30-60s	-2.30	-133.4	128.8	-0.048	1.0000
60-90s	-40.43	-171.6	90.7	-0.841	0.9178
90-120s	5.41	-128.4	139.2	0.110	1.0000

h ED18

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	251	191	311
	Touch	239	179	300
0-30s	Pinch	366	305	426
	Touch	285	224	345
30-60s	Pinch	185	124	245
	Touch	207	147	268
60-90s	Pinch	223	162	283
	Touch	234	173	294
90-120s	Pinch	241	180	301
	Touch	204	144	265

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	11.6	-49.6	72.9	0.373	0.7094
0-30s	81.0	19.7	142.2	2.591	0.0096
30-60s	-22.5	-83.7	38.7	-0.720	0.4715
60-90s	-11.3	-72.5	49.9	-0.362	0.7176
90-120s	36.1	-25.2	97.3	1.155	0.2483

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-114.63	-199.84	-29.4	-3.669	0.0023
30-60s	66.18	-19.04	151.4	2.118	0.2121
60-90s	28.51	-56.70	113.7	0.913	0.8922
90-120s	10.47	-74.74	95.7	0.335	0.9973

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-45.32	-130.53	39.9	-1.451	0.5947
30-60s	32.04	-53.17	117.3	1.026	0.8436
60-90s	5.57	-79.64	90.8	0.178	0.9998
90-120s	34.90	-50.31	120.1	1.117	0.7975

i ED18 w/ Lido

**Table 1** Estimated marginal means (emmean), lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits

time interval		emmean	LCL	UCL
BL (-30-0s)	Pinch	310	185.7	435
	Touch	232	107.5	357
0-30s	Pinch	285	160.4	410
	Touch	299	174.4	424
30-60s	Pinch	238	113.6	363
	Touch	305	180.3	430
60-90s	Pinch	223	98.4	348
	Touch	254	129.3	379
90-120s	Pinch	321	196.0	446
	Touch	230	105.4	355

**Table 2** Contrasts Pinch - Touch. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio and p

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
BL (-30-0s)	78.2	-27.9	184.3	1.445	0.1486
0-30s	-14.0	-120.1	92.1	-0.259	0.7955
30-60s	-66.7	-172.8	39.4	-1.232	0.2179
60-90s	-30.8	-136.9	75.3	-0.570	0.5690
90-120s	90.7	-15.4	196.8	1.675	0.0939

**Table 3** Pinch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	25.30	-122.3	173.0	0.467	0.9902
30-60s	72.13	-75.5	219.8	1.333	0.6708
60-90s	87.28	-60.4	234.9	1.612	0.4893
90-120s	-10.33	-158.0	137.3	-0.191	0.9997

**Table 4** Touch: contrasts BL - time interval. Lower (LCL) and upper (UCL) confidence limits (Confidence level used: 0.95), z ratio

time interval	estimate (effect size)	LCL	UCL	z ratio	p value
0-30s	-66.92	-214.6	80.7	-1.236	0.7301
30-60s	72.76	-220.4	74.9	-1.344	0.6634
60-90s	-21.74	-169.4	125.9	-0.402	0.9945
90-120s	2.15	-145.5	149.8	0.040	1.0000



## 15.2 Supplemente zum Vergleich zwischen den Beobachtern

Tabelle 15.1: Angabe der absoluten Anzahl der Hühnerembryonen an ED18, die eine definierte Verhaltensweise in einem definierten Beobachtungszeitraum gezeigt haben.

Verhaltensweisen ED18 (n=16)		Beak Movement	Mandibulation	Beak Opening	Wide Beak Opening	
Observer 1 (2023)	<i>Touch</i>	BL	4	5	0	0
		0-30s	5	11	3	0
	<i>Pinch</i>	BL	1	6	0	0
		0-30s	1	14	10	14
Observer 1 (2024)	<i>Touch</i>	BL	4	8	0	0
		0-30s	5	11	3	0
	<i>Pinch</i>	BL	2	8	1	0
		0-30s	3	13	9	14
Observer 2 (2024)	<i>Touch</i>	BL	5	5	0	0
		0-30s	9	6	5	0
	<i>Pinch</i>	BL	4	4	1	0
		0-30s	5	8	9	14

Im Folgenden sind ergänzend zu Kapitel 8.2 die Ergebnisse aus den drei Beobachtungsrunden graphisch dargestellt. Abgebildet sind für jeden beobachteten Parameter der prozentuale Anteil der Tiere die ein Verhalten in dem genannten Intervall gezeigt haben (Abbildung 15.1, 15.2, 15.4, 15.5). Außerdem werden in Abbildung 15.3 die Ergebnisse aus einer kombinierten Auswertung von *Beak Shift* und *Mandibulation* dargestellt. Für die bildliche Darstellung wurden die Ergebnisse der beiden Baselines vor dem Stimulus gepoolt.

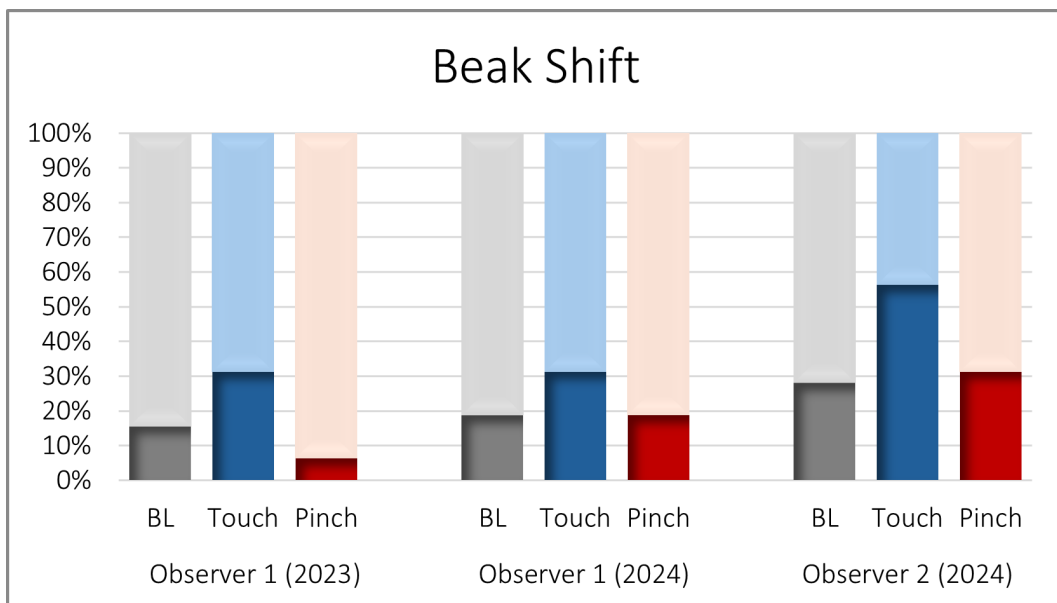


Abbildung 15.1: Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Beak Shift* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024.

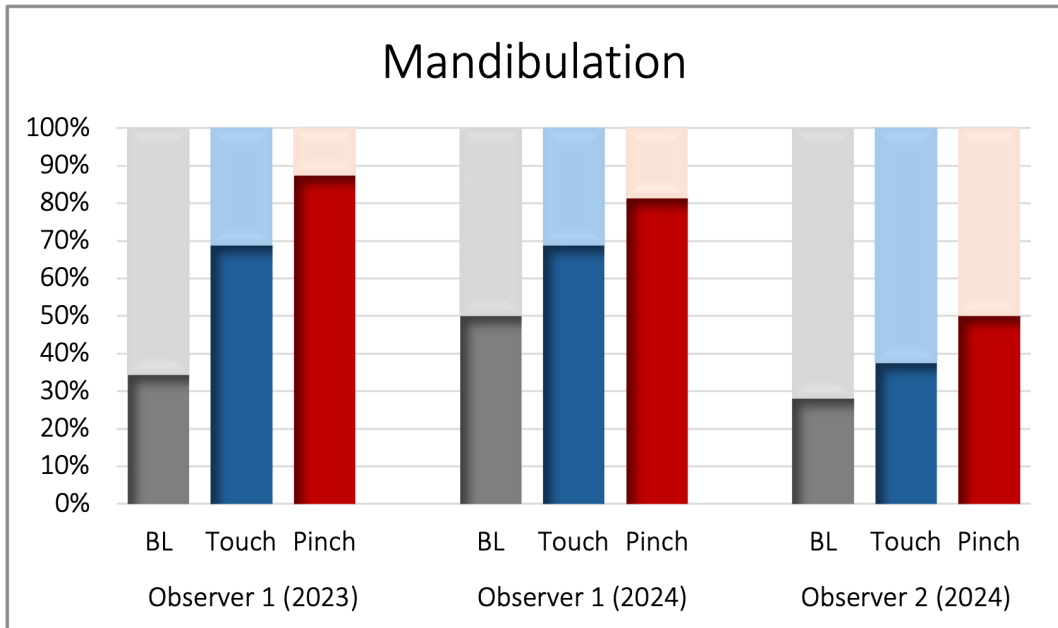


Abbildung 15.2: Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Mandibulation* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024.

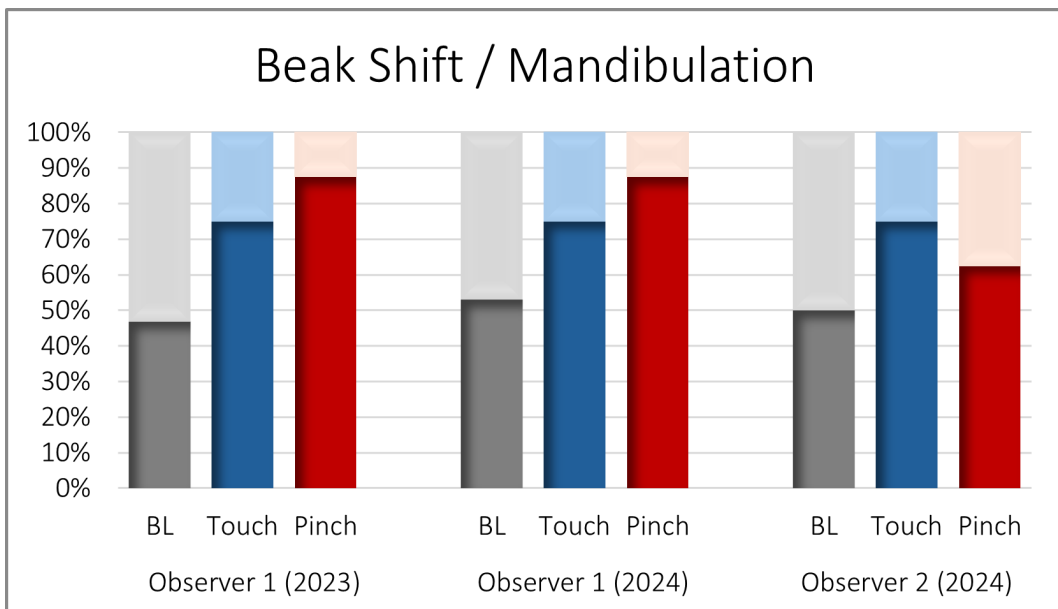


Abbildung 15.3: Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Beak Shift* und / oder *Mandibulation* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024.

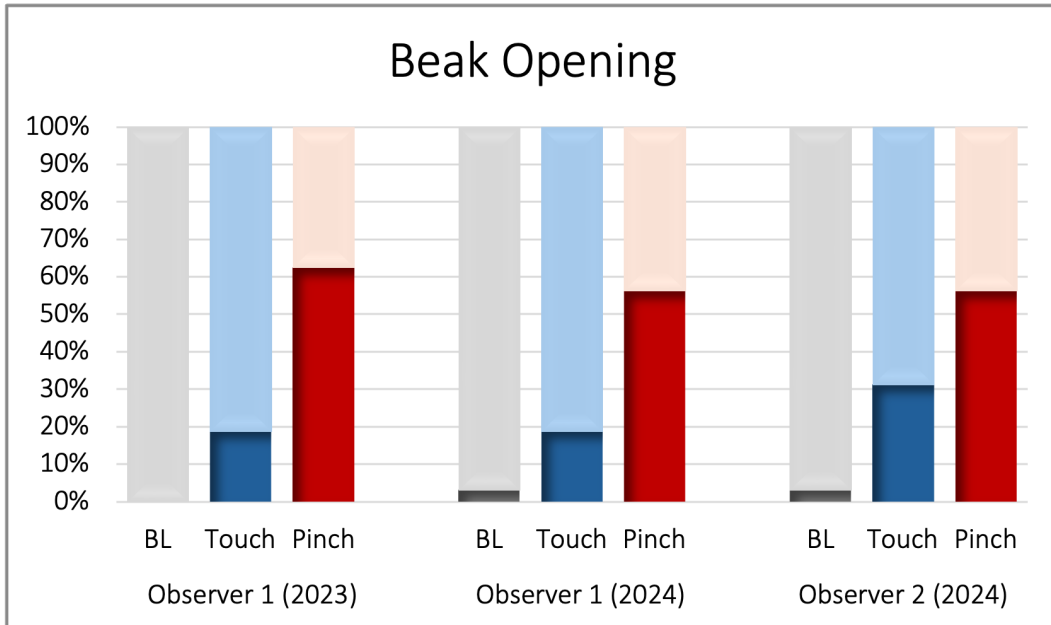


Abbildung 15.4: Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Beak Opening* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024.

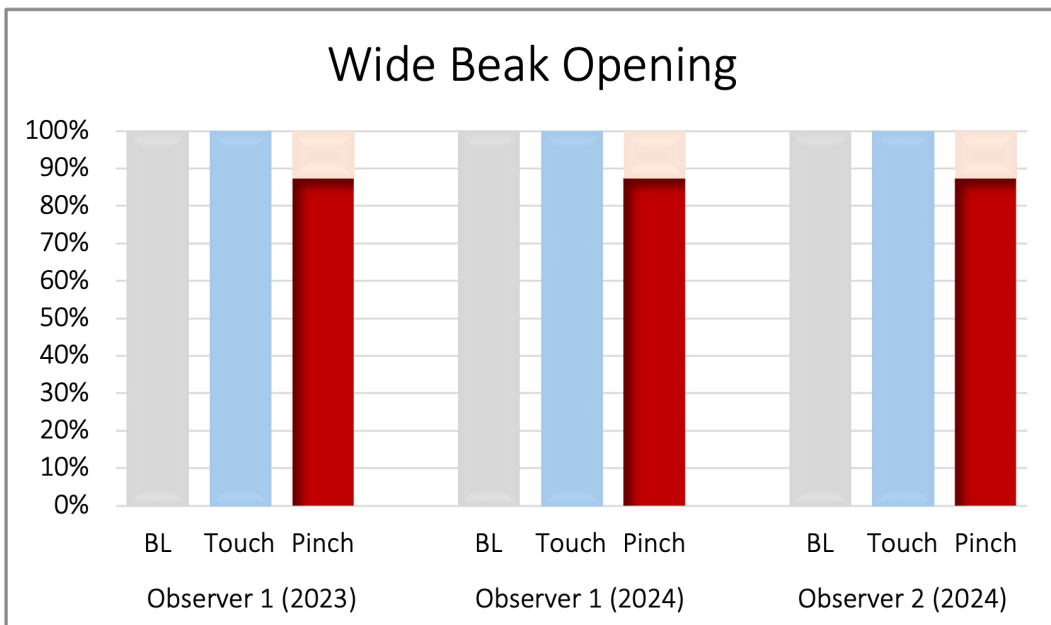


Abbildung 15.5: Prozentualer Anteil der Embryonen an ED18, die *Wide Beak Opening* vor (BL, Baseline: Grau) und nach *Touch* (Blau) und *Pinch* (Rot) zeigten. Ausgewertet durch Observer 1 im Jahr 2023 und 2024 und Observer 2 im Jahr 2024.

## 16. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gebührt meiner Betreuerin, Professor Dr. Christine Baumgartner, die mir die Chance eröffnet hat, an diesem spannenden und akut gesellschaftlich relevanten Thema zu forschen. Danke für deine Unterstützung, das Teilen deiner Erfahrung und die Vielzahl konstruktiver Vorschläge. Gleichzeitig möchte ich betonen, wie sehr ich die Freiheit geschätzt habe, meinen eigenen Interessen zu folgen und neue Wege zu erkunden, während ich an diesem Projekt gearbeitet habe.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Heidrun Potschka bedanken. Vielen Dank für die Übernahme der Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU und die sehr gute Begleitung in diesem Projekt, vor allem im Rahmen des wissenschaftlichen Beirates.

Mein Dank gilt auch dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung für die Finanzierung, die dieses Projekt ermöglicht hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Julia Werner und Dr. Anna Saller für ihre kontinuierliche Unterstützung im Verlauf des Projekts, die Beantwortung von Fragen und die wertvollen Anmerkungen zu meinen Arbeiten. Auch Dr. Judith Reiser möchte ich für ihre Unterstützung und die vielen praktischen Ratschläge danken.

Vielen Dank auch an Yury Zablotzki für die statistischen Auswertungen der Daten und an Janie Ondracek, die mich bei technischen Fragen immer unterstützt hat.

Ich danke auch dem Team in Freising und Thalhausen für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das Handling von Eiern und Hühnerembryonen und die zuverlässige Versorgung mit Eiern.

Ein besonderer Dank geht an Larissa, meine Mitdotorandin. Wir haben alle Hochs und Tiefs dieses Projektes miteinander geteilt und mit (Galgen)humor überstanden. Danke für die Unterstützung, für die vielen Momente des Lachens und die erschreckend lange Liste an (un)passenden Kommentaren in meiner Notizapp!

Des weiteren einen herzlichen Dank an Hamza für die Unterstützung mit Python. Und an dieser Stelle auch ein Dankeschön an Marie, die mich bei der Aufbereitung der Daten unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht auch das Team des OP-Bereichs im ZPF. Tina, André, Lukas, Nikki, Christian, Steffi - danke für die Unterstützung mit den Eier-Diensten und für das offene Ohr in den Pausen zwischen den Versuchen. Und vielen Dank für die stete Versorgung mit Kaffee und Keksen.

Auch allen meinen Freunden, die ich hier nicht namentlich nennen kann möchte ich gerne für ihre Unterstützung danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und besonders bei meinen Eltern bedanken: Ohne eure uneingeschränkte Unterstützung wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.