

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Zahnert

**Olfaktorische Lateralisierungsfähigkeit beim Menschen erzeugt trigeminale
Aktivierungen- eine fMRT-Studie**

Dissertationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden
von
Maximilian Schulz
aus
Erfurt

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	0
2	Einleitung	1
2.1	Die Sinne des Menschen	1
2.2	Das olfaktorische System	2
2.2.1	Anatomie und Physiologie des Riechens	2
2.2.2	Neuronale Verarbeitung	3
2.2.3	Die trigeminale Komponente	6
2.2.4	Olfaktorische Lateralisierung	7
2.3	Funktionelle Magnetresonanztherapie	8
2.3.1	Grundlagen MRT	8
2.3.2	Grundlagen fMRT	10
3	Aufgabenstellung	12
4	Material und Methoden	13
4.1	Ethische Aspekte	13
4.2	Probandenkollektiv	13
4.3	Studienablauf	16
4.3.1	Screeningtest	16
4.3.2	Voruntersuchung und Riechtraining	19
4.3.3	Psychophysische Schwellentestung mit Sniffin Sticks	19
4.3.4	fMRT	21
4.4	Düfte	23
4.5	Auswertung	23
4.5.1	Screeningtest und Intensitäten	23
4.5.2	fMRT	24
5	Ergebnisse	26
5.1	Ergebnisse der Voruntersuchung	26
5.2	Bewertung der Intensität der Düfte	26
5.3	Ergebnisse der fMRT-Untersuchung	27
5.3.1	Kontrollgruppe	28
5.3.2	Lateralisierungsgruppe	29
5.3.3	Vergleich der Gruppen	29

6	Diskussion.....	32
6.1	Einflussfaktoren	32
6.2	fMRT- Ergebnisse	33
6.3	Ausblick.....	37
7	Zusammenfassung/ Summary	39
8	Literaturangaben.....	41
9	Abbildungsverzeichnis	50
10	Tabellenverzeichnis.....	51
11	Anhang	52
11.1	Übersicht Probanden.....	52
11.2	Übersicht der Aktivierungen im fMRT	53
11.3	Probandeninformation.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11.4	Anamnesebogen	54
11.5	Anamnesebogen fMRT	56
11.6	Händigkeitsfragebogen.....	57
11.7	SDI Bogen.....	58
12	Eidesstattliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
13	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Abkürzungsverzeichnis

PEA	Phenylethylalkohol, Rosenduft
PROP	1,2-Propanediol
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie
MRT	Magnetresonanztomografie
EEG	Elektroenzephalographie
sec	Sekunden
OFC	orbitofrontaler Kortex
PC	piriformer Kortex
vs.	versus
v.a.	vor allem
Gruppe L	Lateralisierungsgruppe
Gruppe K	Kontrollgruppe
EDA	elektrodermale Aktivität
N.	Nervus
Ncl.	Nucleus
AAL Atlas	Automated Anatomical Labeling
ROI	Region of interest
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
BOLD	Blood Oxygenation Level-Dependent
VPN	ventraler posteriorer medialer Nucleus
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
BA	Brodman Areal
o.g.	oben genannt

2 Einleitung

2.1 Die Sinne des Menschen

Der Mensch hat fünf Sinne, die ihn während seines gesamten Lebens leiten, helfen und beeinflussen. Wie das Sehen und Hören ist das Riechen bilateral angelegt. Es existieren zwei Nasenlöcher, zwei Riechschleimhäute, zwei Bulbi olfactorii. Es besteht somit die Möglichkeit seitengetrennt, d.h. räumlich riechen zu können. Interessanterweise ist nur wenigen Menschen die Fähigkeit gegeben, relativ spezifische olfaktorische Düfte, also Düfte die nur den N. olfactorius aktivieren, zu lokalisieren. Der Großteil vermag bei der seitengetrennten Duftpräsentation keine richtige Zuordnung zu treffen. Ob diese Fähigkeit angeboren oder erworben ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Möglicherweise kann das Lokalisieren von Düften auch erlernt werden (Dalton et al., 2002). Doch welche Rolle spielt diese Fähigkeit? Gibt es einen Unterschied in der neuronalen Verarbeitung? Dabei scheinen unterschiedliche Parameter das Lokalisieren der Düfte zu beeinflussen. Dazu gehören die Qualität, ob olfaktorisch oder trigeminal, sowie die Quantität in Bezug auf Größe und Intensität der Duftvolumina. Ziel dieser Studie war es, Unterschiede in der Geruchsverarbeitung relativ spezifischer olfaktorischer Düfte zwischen Menschen mit und ohne Lateralisierungsfähigkeit darzustellen. Dazu wurde die Methode der funktionellen Magnetresonanztomografie verwendet.

2.2 Das olfaktorische System

2.2.1 Anatomie und Physiologie des Riechens

Duftmoleküle erreichen die menschliche Nase durch die beiden Nasenlöcher, welche durch das Septum nasale getrennt sind. Anschließend passieren sie die Nasenmuscheln (Concha nasalis superior, medialis, inferior) und treffen auf das Riechepithel. Dieses befindet sich kraniodorsal der mittleren Nasenmuschel und wird als Regio olfactoria bezeichnet. Die Gesamtfläche beträgt bei einem Erwachsenen ca. 500 Quadratmillimeter. Die Riechschleimhaut besteht aus mehrreihigem olfaktorischen Epithel und der darunter liegenden Lamina propria, in der sich neben den Leitungsbündeln (Axonen) der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) auch Blutgefäße, Bindegewebe, Bowman-Drüsen sowie Stütz- und Basalzellen befinden. Die Basalzellen ermöglichen eine Regeneration der ORN, was sie von anderen neuronalen Geweben unterscheidet (Engelhardt, 2009). Das ORN ist das erste Neuron der Riechbahn. Es ist bipolar, kann die Duftmoleküle über einen Rezeptor binden und die umgewandelten Impulse anschließend über ein Axon weiterleiten (Hummel and Welge-Lüssen, 2008a). Die Aktivierungen lösen über ein G-Protein und das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) als Second Messenger die Öffnung der Kationenkanäle und den Einstrom von Calcium aus. Dies führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials und damit zur Signaltransduktion (Frings, 2001). Die Reizweiterleitung erfolgt über die Axone der Riechzellen, die sogenannten Filiae olfactoriae, welche durch die Lamina cribrosa ziehen und im Bulbus olfactorius auf das zweite Neuron der Riechbahn umgeschaltet werden.

2.2.2 Neuronale Verarbeitung

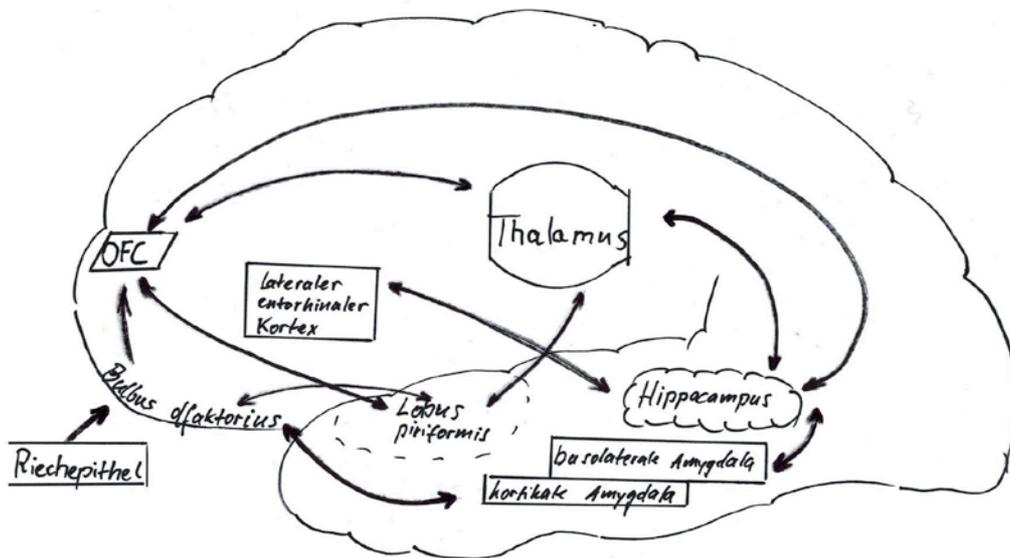


Abbildung 1: Neuronale Verarbeitung

Die Abb. zeigt schematisch die Stationen des zentralen Riechsystems und die Weiterleitung des Duftreizes vom Riechepithel (1. Neuron) über den Bulbus olfactorius, in dem die Umschaltung auf die Mitralzellen erfolgt (2. Neuron). Die Fortsätze der Mitralzellen ziehen als Tractus olfactorius zu primären olfaktorischen Cortices. Diese Regionen sind multipel miteinander verknüpft.

Die Filae olfactoriae bilden in ihrer Gesamtheit den Nervus olfactorius, den ersten Hirnnerv. Die erste Reizumschaltstelle der Riechbahn befindet sich im Bulbus olfactorius, der in der vorderen Schädelgrube lokalisiert ist und als eine kolbenartig aufgetriebene Struktur imponiert. Vor allem durch inhibitorische Signalmodulation kommt es dort zur ersten Kontrastierung des Riecheindrucks. Die Mitralzellen stellen das zweite Neuron der Riechbahn dar. Die Axone dieser Zellen werden als Tractus olfactorius lateralis bezeichnet (Hummel and Welge-Lüssen, 2008b). Dieser

Tractus zieht durch den Sulcus olfactorius bis hin zum olfaktorischen Kortex. Als primär olfaktorischer Kortex werden piriformer Kortex, Amygdala und Area entorhinalis bezeichnet, zu denen die olfaktorischen Afferenzen gelangen. Wahrnehmung, Interpretation und Integration von Düften findet vor allem im sekundär olfaktorischen Kortex statt (Gottfried, 2006). Sekundär olfaktorische Areale sind u.a. in Insula, Hippocampus, Hypothalamus, Gyrus Cinguli, Cerebellum und Basalganglien lokalisiert und stehen mit beiden Hemisphären in Verbindung. Die Duftwahrnehmung erfolgt über ein komplex verschaltetes Netzwerk. Abhängig von der Art, Aufgabe und individuellem Stellenwert des Duftes werden die Informationen in den jeweiligen Arealen unterschiedlich verarbeitet (Savic et al., 2000). Eine funktionelle Einteilung der Hemisphären ist mit Hilfe der fünfzig verschiedenen Brodmann Areale (BA) möglich (Brodmann, 1909). Hierbei liegen olfaktorische Bereiche u.a. im rechten OFC (BA11) und im linken inferioren medialen Frontallappen (BA 25) (Royet and Plailly, 2004).

Das olfaktorische System sendet den größten Teil der Duftinformationen ipsilateral, wohingegen nur vereinzelt kontralaterale Schnittstellen zwischen den beiden Hemisphären bestehen. Diese Bahnen verlaufen in der Commissura anterior, dem Corpus Callosum und wahrscheinlich der Commissura hippocampi. (Brand et al., 2002). Hohe Geruchskonzentrationen beziehen den linken inferioren Gyrus frontalis (BA 47) mit ein. Dieser wird in Verbindung mit dem semantischen Gedächtnis gebracht. Es charakterisiert das Allgemeinwissen, welches sich ein Mensch im Laufe seines Lebens aneignet. Mit Hilfe der zerebralen Bildgebung konnte eine komplexe Interaktion zwischen primärem und sekundärem olfaktorischen Kortex dargestellt werden (Royet et al., 1999).

Das olfaktorische System ist auf allen Ebenen nicht streng symmetrisch. Es gibt Hinweise dafür, dass das rechte Nasenloch das dominantere ist (Savic and Berglund, 2000; Thuerauf et al., 2008). Doch dies wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Doty and Kerr, 2005). Stimulationen des N. olfactorius werden primär ipsilateral, die des N. trigeminus hingegen kontralateral verarbeitet. Außerdem wird eine spezialisierte Funktion und Dominanz der rechten Hemisphäre vermutet (Zatorre and Jones-Gotman, 1990; Savic and Gulyas, 2000). Niedrigschwellige Reize generieren

sowohl bei monorhinaler, als auch bei birhinaler Stimulation keinen Unterschied in der Verarbeitung zwischen linkem und rechtem Nasenloch. In tierexperimentellen Studien wurden querverlaufende Fasern zwischen PC, Nucleus olfactorius anterior, Amygdala, lateralem entorhinalen Kortex, Hypothalamus, Locus caeruleus und den Raphekernen des Bulbus olfactorius nachgewiesen, die ein Filtern und Selektieren von olfaktorischen Signalen ermöglichen (Shipley and Ennis, 1996).

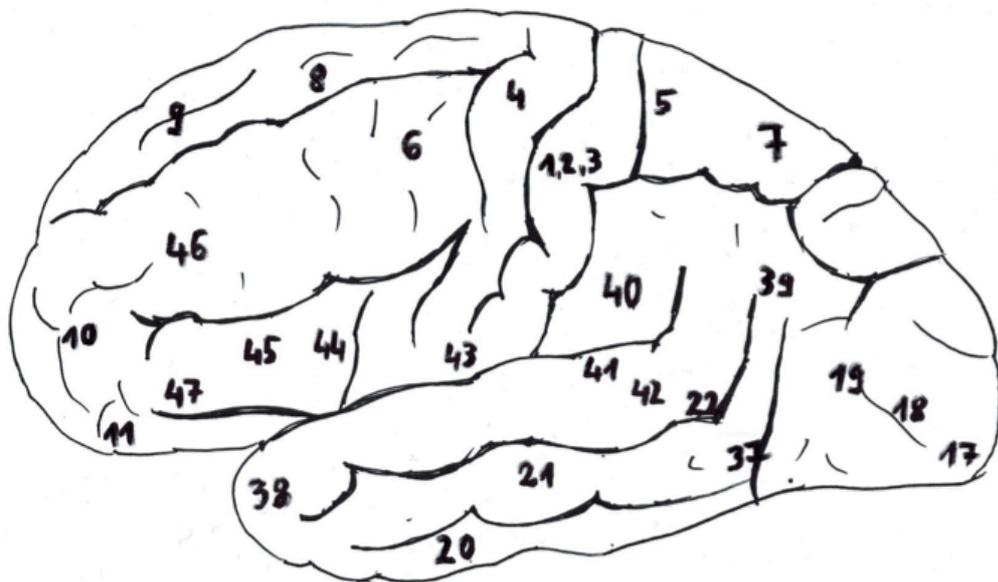


Abbildung 2: Brodmann- Areale

Brodman- Areale (BA) sind die nach der Zyto- und Myeloarchitektonik in Felder eingeteilten Großhirnrindenzellen des Menschen.

Olfaktorisch relevante Areale befinden sich u.a. im rechten OFC (BA11), im linken inferioren medialen Frontallappen (BA 25) (Duftwahrnehmung und Verarbeitung), sowie im linken inferioren Gyros frontalis (BA 47)

2.2.3 Die trigeminale Komponente

Beide Nasenhöhlen sind somatosensorisch vom N. ophthalmicus und N. maxillaris innerviert. Sie sind zwei der drei Hauptäste des Nervus trigeminus (V. Hirnnerv).

Zahlreiche kleine Nervenäste aus Nasenseptum, Nasenspitze, Nasenhöhle und hinterer Siebbeinhöhle verlaufen als Nn. ethmoidales anteriores et posteriores. Diese ziehen dann durch die gleichnamigen Foramina und bilden in ihrer Gesamtheit den N. nasolacrimalis. Nach dem Durchtritt durch die Fissura orbitalis superior verläuft dieser nun als N. ophthalmicus bezeichnete Strang bis zum Ganglion trigeminale.

Ein weiteres sensibles Areal im hinteren Anteil des Cavum nasi wird durch die Rr. nasales posteriores inferiores et superiores innerviert. Diese ziehen über das Ganglion pterygopalatinum als Rr. ganglionares durch das Foramen rotundum nach intrakraniell, wo sie sich dem Hauptast des N. maxillaris anlagern. Dieser verläuft nun ebenfalls zum Ganglion trigeminale (Aumüller et al., 2010).

Elektrophysiologische Auswertungen von Hummel et al. (1996) ergaben eine hohe trigeminale Chemosensitivität im anterioren Drittel des Septums. Außerdem stellte sich heraus, dass auch das olfaktorische Epithel von trigeminalen Nervenfasern innerviert wird (Getchell et al., 1989). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass olfaktorische Rezeptorantworten durch die trigeminale Mitaktivierung reflexartig peripher (Bouvet et al., 1988, 1987, 1984) und zentral (Stone et al., 1968) modifiziert werden. Die Zellkörper der trigeminalen Afferenzen liegen im Ganglion trigeminale an der Spitze des Felsenbeines

Dort ist es möglich, elektrophysiologische Signale abzuleiten, nachdem mit einem trigeminalen Duftstoff stimuliert wurde. Die Afferenzen ziehen von dort zu den sensiblen Nuclei mesencephalici, principitales und spinales nervi trigemini. Auch werden nozizeptive Impulse aus der Nasenhöhle in die Lamina superficialis des Nucleus spinalis nervi trigemini projiziert (Anton and Peppel, 1991).

Es wird angenommen, dass Informationen von den sensorischen Trigeminskernen über den lateralen parabrachialen Komplex zur Amygdala gelangen (Bernard et al., 1989). Dabei projizieren die Neuronen des Nucleus spinalis zu den ventralen posterioren medialen (VPN) und intralaminären Kernen des Thalamus.

Ein Teil der aufsteigenden Fasern verläuft ipsilateral, wohingegen die Mehrzahl zur kontralateralen Seite kreuzt und den anterolateralen Strang ergänzt (Barnett et al., 1995). Koaktivierungen zwischen olfaktorischem und trigeminalem System scheinen im VPN des Thalamus stattzufinden (Inokuchi et al., 1993).

Die Projektion vom VPN aktiviert sowohl den primären als auch sekundären somatosensorischen Kortex. Der primäre somatosensorische Kortex (BA 1,2,3) befindet sich auf dem Gyrus postcentralis. Der sekundäre somatosensorische Kortex befindet sich posterior davon. Es konnte gezeigt werden, dass trigeminale Stimulation von jeweils einem Nasenloch immer eine bilaterale Aktivierung im sekundär somatosensorischen Kortex erzeugt (Huttunen et al., 1986). Auch der ventrale OFC scheint an der weiteren kognitiven Verarbeitung von trigeminalen Reizen beteiligt zu sein (Kettenmann et al., 1996; Hummel et al., 2005; Julie A. Boyle et al., 2007)

Somit lässt sich feststellen, dass in vielen Ebenen der neuronalen Verarbeitung von olfaktorischen und trigeminalen Reizen Koaktivierungen und Verbindungsbahnen bestehen. Dies betrifft beispielsweise das olfaktorische Epithel, die trigeminalen Kerngebiete und den Thalamus.

2.2.4 Olfaktorische Lateralisierung

Olfaktorische Lateralisierung ist die Fähigkeit, Düfte bei seitengetrennter Applikation zwischen den Nasenlöchern zu lokalisieren und richtig zuordnen zu können. Dies ist bei den Menschen unterschiedlich ausgeprägt, also nicht jeder kann lateralisieren, aber jeder Duft kann prinzipiell lateralisiert werden. Dabei sind Zusammensetzung und Konzentration (Hummel et al., 2003; Frasnelli and Hummel, 2005) der Duftstoffe die entscheidenden Faktoren. Während trigeminal-olfaktorische, also gemischte Düfte wie Menthol, von allen Menschen zugeordnet werden können, trifft das für relativ spezifische olfaktorische Düfte nur bei wenigen Menschen zu.

Hohe Duftkonzentrationen stimulieren sowohl den N. olfactorius als auch den N. trigeminus (Skramlik, 1925; Doty et al., 1978; Kobal et al., 1989; Frasnelli et al., 2011). Hierbei wird die Abhängigkeit der Lateralisierungsfähigkeit von der

trigeminalen Mitaktivierung deutlich, mit Hilfe derer die Seite der Duftapplikation problemlos lokalisiert werden kann (Lundström et al., 2012). Eine Studie von Negoias (Negoias et al., 2013) beschreibt außerdem, dass die Fähigkeit zu Lateralisieren trainiert werden kann, wenn die trigeminale Komponente genutzt wird.

Experimentiert man mit olfaktorischen Düften, gibt es zwei Möglichkeiten der Präsentation. Entweder können diese aktiv eingeatmet oder passiv appliziert werden. Bei orthonasaler Applikation mit retropharyngealem Verschluss wird eine exakte neuronale Darstellung ermöglicht, die nicht von Atemzyklen abhängig ist. Untersuchungen von Frasnelli et al. (2009, 2010) belegen, dass sich bei Probanden, die nicht lateralisieren können, keine Unterschiede zwischen beiden Methoden zeigen. Die Lateralisierer dagegen konnten sowohl bei aktiver, aber vor allem bei passiver Beduftung eine überdurchschnittliche Trefferquote vorweisen (Frasnelli et al., 2011).

2.3 Funktionelle Magnetresonanztherapie

2.3.1 Grundlagen MRT

Die Magnetresonanztomografie (MRT) oder auch Kernspintomografie ist ein Verfahren zur Erzeugung von Schnittbildern in einer frei wählbaren Raumebene ohne Verwendung von Röntgenstrahlung (Reiser et al., 2011). Grundlage ist die Eigenschaft von elektrisch geladenen Teilchen, sich im Magnetfeld auszurichten und ihre magnetischen Zustände zu ändern.

Atome haben eine unterschiedliche Anzahl von Protonen und Elektronen, wodurch ein messbares magnetisches Moment nach außen tritt. Da der menschliche Körper zu großen Teilen aus Wasser besteht, wird in der MRT hauptsächlich das Verhalten von Wasserstoffkernen im Magnetfeld gemessen.

Jedes Proton hat einen Eigendrehimpuls, welcher als Kernspin bezeichnet wird. Dieser induziert ein magnetisches Dipolmoment, das im Ruhezustand ungerichtet in alle Vektoren zeigt und somit vollständig zum magnetischen Nullvektor kompensiert wird. Wird nun ein starkes Magnetfeld und ein hochfrequentes Wechselfeld im

Radiofrequenzbereich angelegt, richten sich die magnetischen Dipole entlang der Feldlinien parallel oder antiparallel aus. Hierbei kommt es außerdem zu sogenannten Präzessionsbewegungen, bei denen sich Atomkerne mit ungerader Nukleonenzahl kreisförmig um die Längsachse bewegen. Die Präzessionsfrequenz bringt die Protonen in eine Resonanz, die sogenannte Larmorfrequenz, die die Energieübertragung ermöglicht. Die meisten Protonen nehmen durch das Magnetfeld die energetisch günstigere Längsmagnetisierung ein, wohingegen die Hochfrequenzimpulse für die Quermagnetisierung sorgen. Die Präzessionsbewegungen werden synchron. Wird anschließend das Magnetfeld abgeschaltet, geben die Protonen ihren magnetischen Impuls wieder ab und es kommt zur Relaxation. Dies wird gemessen und für die Bildgebung genutzt. Hierbei kommt es zeitgleich unter Energieabgabe zur Rückkehr in die Längsmagnetisierung und zur Desynchronisierung der Präzessionsbewegungen. Die Zeitkonstante der Längsrelaxation heißt T1 oder Spin-Gitter-Relaxationszeit und beträgt 300-2000 ms. Die der Querrelaxation wird T2 oder Spin-Spin-Relaxation genannt und beträgt 30-150 ms. Aufgrund der sehr kleinen magnetischen Impulse der Protonen werden diese mehrmals angeregt und die gemessenen Signale elektronisch gemittelt (Averaging). Die Zeit zwischen zwei Anregungen heißt Repetitionszeit (TR), die Zeit zwischen Anregung und Signalaufnahme ist die Echozeit (TE). Entscheidend für den Bildkontrast sind Gewebeparameter (T1, T2, Protonendichte, Wassergehalt), Sequenzparameter (TR, TE) und Sequenztyp. T1-gewichtete Sequenzen weisen eine kurze TE und TR auf, woraufhin z.B. weiße Hirnsubstanz oder Fett hyperintens (hell) und graue Hirnsubstanz und Muskel hypointens (dunkel) erscheint. T2-gewichtete Sequenzen hingegen sind durch längere TR und TE gekennzeichnet. Gewebe mit langer T2, wie Wasser erscheinen hell, Gewebe mit kurzer T2 z.B. Muskel dunkel.

In der Neuroradiologie kommen T1-gewichtete Aufnahmen am häufigsten zum Einsatz (Reiser et al., 2011).

2.3.2 Grundlagen fMRT

Die funktionelle Magnetresonanztomografie (fMRT) ist ein radiologisches Verfahren, mit dem man indirekt neuronale Aktivierungen darstellen kann. Die Messung basiert auf Änderungen des Blutflusses und der Oxygenierung von Hämoglobin. Stimuliert ein Duftreiz die Riechsinneszellen, haben die Neuronen einen höheren Energie- und Stoffwechselumsatz als im Ruhezustand. Die aktiven Hirnareale werden mehr durchblutet, wodurch der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) steigt. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften von sauerstoffreichem, d.h. oxygeniertem und sauerstoffarmen, d.h. desoxygeniertem Blut zu Nutze. Diese Magnetisierbarkeit heißt Suszeptibilität. Die sogenannten diamagnetischen Eigenschaften des Oxyhämoglobins verstärken wie umliegendes Hirngewebe das MRT-Signal, während die paramagnetischen Eigenschaften des Desoxyhämoglobins es abschwächen. Durch die erhöhte Oxyhämoglobinkonzentration im aktivierten Gewebe nimmt somit die Signalsuppression ab. Diese Signaländerung wird „Blood Oxygenation Level-Dependent“ (BOLD)-Effekt genannt (Ogawa et al., 1993). Die Reaktion des rCBF auf die neuronale Stimulation geschieht mit einer Latenzzeit von ungefähr 1-2 Sekunden, gefolgt von dem sogenannten Undershoot (Abb. 3: „Bold-Effekt“). Aus diesem Grund sollte bei der Planung des Versuchsaufbaus die Reizdauer beachtet werden.

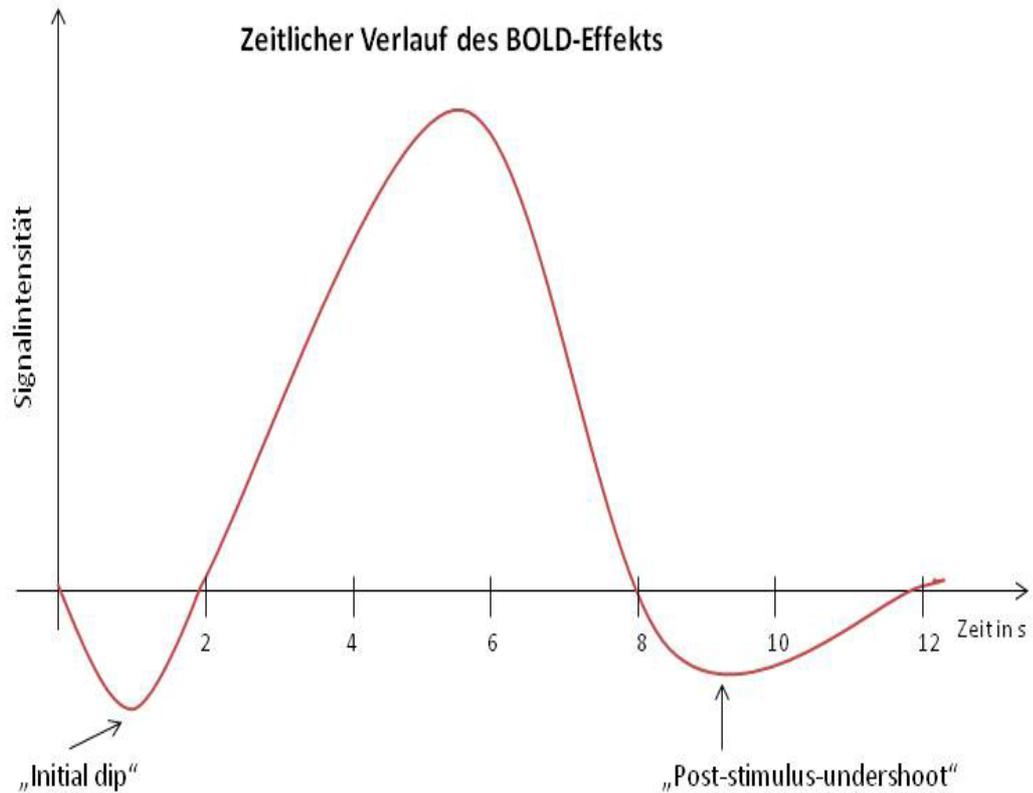


Abbildung 3: "Bold Effect"

Die X-Achse stellt die Zeit in Sekunden dar, die Y-Achse zeigt die Signalintensität im fMRT. Der „Initial dip“ beschreibt die Latenzzeit von ca. 2s, die nach Applikation eines Reizes bis zur Änderung der Oxygenierung des Bluts vergeht. Ein Maximum an Signaländerung kann ca. 4-6s nach dem Reiz beobachtet werden. Der folgende Undershoot nach dem Stimulus, also eine Art Refraktärzeit, kann bis zu 30s dauern.
(modifiziert nach <http://www.fmri-easy.de/fmri.htm>)

3 Aufgabenstellung

Während die räumliche Wahrnehmung eines Duftstoffes im Tierreich von evolutionärer Bedeutung zu sein scheint, ist die Fähigkeit, einen Duft bei seitengetrennter Applikation richtig zuzuordnen, nur wenigen Menschen gegeben.

In der Literatur werden widersprüchliche Ansätze über den Nutzen und die neuronale Verarbeitung dieser zusätzlichen Sinnesleistung diskutiert. Ein wichtiger Faktor für die Lateralisierbarkeit könnte auch bei olfaktorischen Düften die trigeminale Komponente sein (Brand et al., 2002).

In dieser Studie sollten nun gezielt neuronale Verarbeitungsmuster von Menschen mit Lateralisierungsfähigkeit mit denen ohne Lateralisierungsfähigkeit verglichen werden. Dazu wurden mit Hilfe eines standardisierten Screeningtests Probanden mit Lateralisierungsfähigkeit identifiziert. Die jungen, gesunden Probanden wurden an Hand der Anzahl richtig zugeordneter Ergebnisse in zwei Gruppen aufgeteilt, eine Lateralisierungsgruppe und eine Kontrollgruppe. Mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie wurde die komplexe Verarbeitung beim Riechen eines Duftes dargestellt, um herauszufinden, ob es Unterschiede in der neuronalen Aktivität zwischen Menschen mit und ohne Lateralisierungsfähigkeit gibt. Da von den meisten Düften nicht nur das olfaktorische, sondern auch das trigeminale System aktiviert wird (Silver et al., 1985), verwendeten wir bewusst den relativ spezifischen olfaktorischen Duftstoff Phenylethylalkohol (PEA). Ein definiertes Stimulusvolumen von 11ml sowie die orthonasale Applikation des Duftes mit retropharyngealem Verschluss schufen standardisierte Bedingungen. Wir vermuteten, dass die trigeminale Aktivierung bei olfaktorischen Düften ausschlaggebender Faktor für die Lateralisierungsfähigkeit ist.

4 Material und Methoden

4.1 Ethische Aspekte

Die prospektive Studie entsprach den Anforderungen der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden positiv begutachtet (EK 157052012).

Alle Probanden wurden zunächst mündlich und schriftlich über alle Aspekte der Studie aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung. Außerdem beantworteten sie einen Händigkeits- und einen Anamnesebogen. Die Aufwandsentschädigung betrug 15 €/Stunde.

4.2 Probandenkollektiv

Insgesamt nahmen 152 Personen am Screeningtest teil, von denen abhängig vom Ergebnis 19 einer Lateralisierungsgruppe L und 16 einer Kontrollgruppe K zugeteilt wurden. Die Eignung der Probanden erfolgte mittels eines standardisierten Anamnesebogens, um störende Begleiterkrankungen auszuschließen (Anhang 11.4). Die Rechtshändigkeit wurde erfragt und anschließend mittels Fragebogen sichergestellt. Um eine größere Seitendifferenz im Geruchsvermögen auszuschließen, erfolgte ein seitengetrennter Schwellentest zwischen linker und rechter Seite mittels eines standardisierten Riechtests mit sogenannten „Sniffin’ Sticks“ (Kobal et al., 2000). Ein Abweichen von mehr als zwei Punkten führte zum Ausschluss. Nach dem Riechtraining und der Voruntersuchung wurden vier Probanden der Gruppe L, sowie ein Proband der Gruppe K aus gesundheitlichen Gründen ausgeschlossen. Letztendlich nahmen 30 gesunde Probanden an der Studie teil (Gruppe L: 15 Probanden, davon 9 Frauen, 6 Männer, 22-36 Jahre, Durchschnittsalter $25,5 \pm 3,5$; Gruppe K: 15 Probanden, davon 7 Frauen, 8 Männer, 24-30 Jahre, Durchschnittsalter $25,9 \pm 1,9$ Jahre).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in Alter oder Geschlecht zwischen den beiden Gruppen.

Zusammensetzung des Probandenkollektives

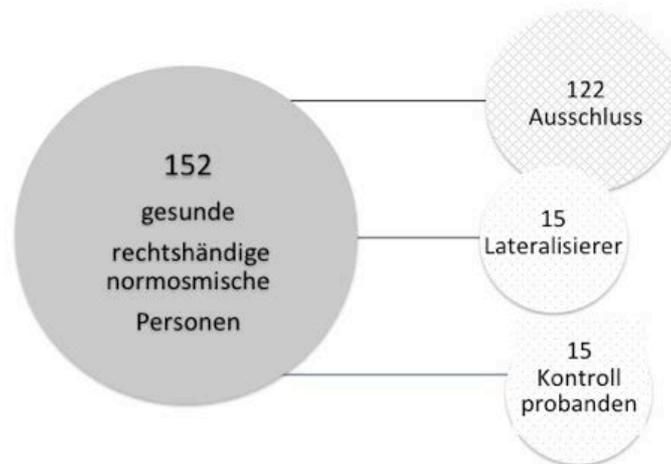


Abbildung 4: Probandenkollektiv

Nach dem Screeningtest wurden 35 Probanden in Gruppe L und Gruppe K eingeteilt. Nach allen Voruntersuchungen und Tests erfolgte die Einteilung unter Ausschluss von 5 weiteren Probanden. Letztendlich wurden 122 Personen ausgeschlossen

Ausschlusskriterien:

- Alter < 18, >40
- Riech- und Schmeckstörungen
- Schwangerschaft und Stillzeit
- wesentliche gesundheitliche Beeinträchtigungen (z.B. Diabetes mellitus, M. Parkinson, Niereninsuffizienz), die mit Störungen der Riechfunktion einhergehen können
- Personen mit akuten oder chronischen Entzündungen der Nase und Nasennebenhöhlen
- Personen mit relevanten Vor- bzw. Begleiterkrankungen im HNO-Bereich
- MRT- bedingte Ausschlusskriterien: Herzschrittmacher, künstliche Herzklappe, Gefäßclips, Gelenkprothesen, ausgedehnte Zahnspangen, Granat- und sonstige Metallsplitter, Intrauterin-Spirale, Akupunkturnadeln, Tätowierungen, Metall im Körper, Platzangst

4.3 Studienablauf

4.3.1 Screeningtest



Abbildung 5: Testgerät Lateralisierung, Schlafbrille

In dieser Abb. sind das Lateralisierungstestgerät und die Schlafbrille dargestellt. Nachdem die Probanden mit der Schlafbrille verblindet wurden, konnte die randomisierte Testreihe mit jeweils 20 Testhüben durchgeführt werden



Abbildung 6: Screeningtest mit Testgerät

Diese Abb. zeigt den Screeningtest mit dem Testgerät in dem sich zwei Flaschen mit unterschiedlichen Düften befanden. Das Kreuz kennzeichnet die mit dem Duft versehene Seite. Vor jedem der 20 Testhübe wurde das Gerät randomisiert gedreht, wobei der Proband nach Duftapplikation jeweils die vermutete Seite benennen musste.

Die Studie begann mit der Rekrutierung und Einteilung geeigneter Probanden, wobei sich die freiwilligen Teilnehmer einem 15-minütigen Screening Testes unterziehen mussten. Hierbei wurde ein Lateralisierungstestgerät (Abb. 5) verwendet, in dem sich 2 Flaschen mit zwei unterschiedlichen Düften befanden. Flasche 1 enthielt eine Kontrolllösung, Flasche 2 den Duftstoff. Um trigeminale Irritationen zu vermeiden, wurde ein Testgerät verwendet, das ein definiertes Volumen von 11 ml pro Hub abgibt. Jeder Teilnehmer wurde mit einer Schlafbrille verblindet und 20 Testhüben ausgesetzt. Nach jedem Hub wurde das Gerät randomisiert gedreht, wobei die Probanden jeweils die vermutete Seite benennen mussten. Die Duftwahrnehmung der Probanden erfolgte orthonasal mit retropharyngealem Verschluss. Bei einer

Trefferquote ab 75 Prozent (≥ 15 oder ≤ 5) wurde von einer Lateralisierungsfähigkeit ausgegangen und war somit Einschlusskriterium für Gruppe L (Hummel and Livermore, 2002; Hummel et al., 2003; Frasnelli et al., 2009). Die Gruppenstärke wurde mit 15 Probanden festgelegt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in Alter und Geschlecht.

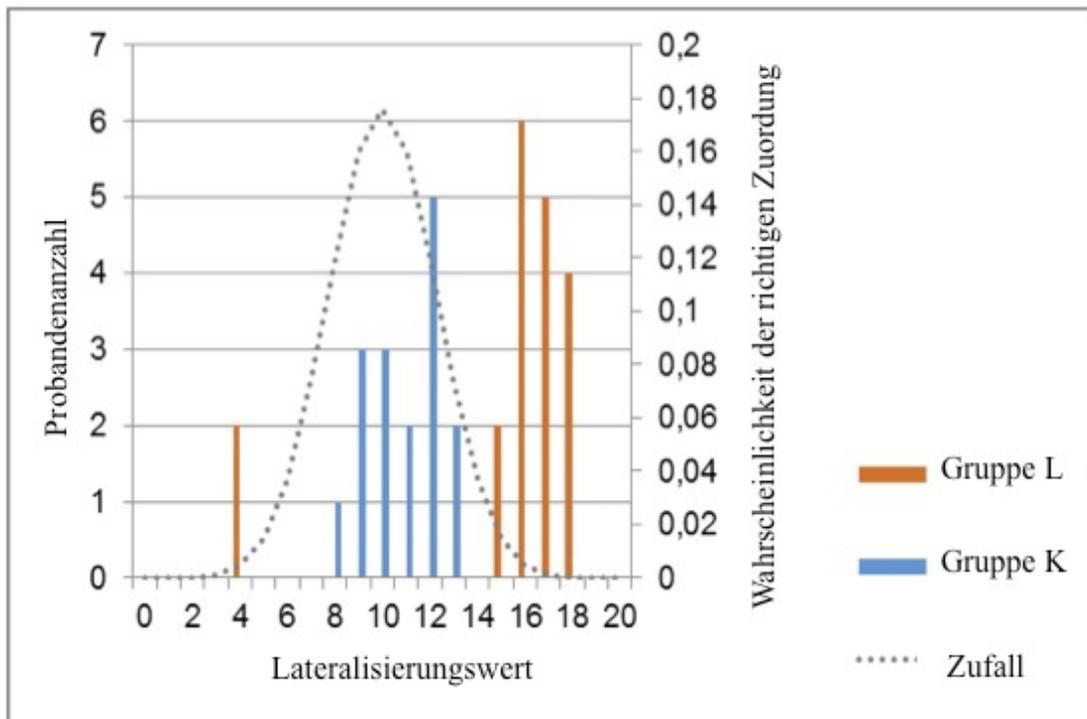


Abbildung 7: Darstellung der Lateralisierungsscores

In dieser Abb. sind die Lateralisierungsscores der Probanden aus Gruppe L und Gruppe K dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die Normalverteilung. Probanden mit Werten von 5 und weniger oder 15 und mehr kamen in die Gruppe L. Die „area under the curve“ repräsentieren 95,8 %.

4.3.2 Voruntersuchung und Riechtraining

Die im Screening ausgewählten Probanden wurden zu einem ersten Termin geladen, der aus vier Abschnitten bestand.

Im ersten wurde eine ausführliche Anamnese mittels Anamnesebogen über Vor- und Begleiterkrankungen, Operationen, Rauch- und Alkoholverhalten sowie Expositionen gegenüber Chemikalien erhoben (Anhang 11.4). Außerdem wurde ein Händigkeitsfragebogen (Anhang 11.6) beantwortet, sowie die Einverständniserklärung über das fMRT (Anhang 11.3) unterzeichnet. Im zweiten Teil wurde mit Hilfe eines seitengetrenten Schwellentests (Sniffin Sticks) ein stark differierendes Riechvermögen zwischen links und rechts als Ursache der Lateralisationsfähigkeit ausgeschlossen. Abschnitt drei diente dem Erlernen des retropharyngealen Verschießens. Dieses entsteht durch Kontraktion des Velum pharyngeum. Nur so erfolgt der Lufteinstrom einzig durch den Mund und verhindert eine Luftverwirbelung in der Nase. Diese Technik musste während der Olfaktometer-Duftexposition angewendet werden, damit keine Vermischung des Duftstromes zwischen linker und rechter Seite entstand. Ziel des vierten Teiles war es, das Experiment mit dem Olfaktometer kennenzulernen, um einen reibungslosen Ablauf während der MRT zu gewährleisten. Hierbei wurde den Probanden eine randomisierte Abfolge von 20 Duftstimuli in das linke bzw. rechte Nasenloch verabreicht. Die Stimuli wurden mit Hilfe eines Olfaktometers (Abb. 9) generiert und anschließend bezüglich Intensität auf einer Scala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 10 (sehr stark wahrnehmbar) bewertet und die vermutete Seite (links oder rechts) evaluiert.

4.3.3 Psychophysische Schwellentestung mit Sniffin Sticks

Vor dem Beginn der Messungen erfolgte eine Testung der olfaktorischen Funktion jedes Probanden mittels Sniffin Sticks. Psychophysische Riechtestungen basieren auf der subjektiven Einschätzung von Düften und der aktiven Mitarbeit der Probanden.

Ziel der Schwellentestung war es, herauszufinden, ab welcher Duftkonzentration die Probanden den Duftstoff Phenylethylalkohol (PEA, Rosenduft) riechen konnten. Zusätzlich sollte eine Schwellenabweichung von mehr als zwei Punkten zwischen linkem und rechten Nasenloch ausgeschlossen werden. Es wurden Stifte mit 16 unterschiedlichen Duftkonzentrationen von PEA verwendet, bei denen Stift 1 die höchste Konzentration aufwies. In einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 nahm diese bis Stift 16 ab. Den verblindeten Probanden wurden drei Stifte angeboten, von denen zwei einen neutralen und einer den zu identifizierenden Duftstoff enthielten. Begonnen wurde mit Stift 16. Anschließend wurde die Duftkonzentration in 2 Stufen erhöht, bis der Proband zweimal richtig identifizierte. Die individuelle Riechschwelle war damit erreicht. Um eine sichere Aussage treffen zu können, wurden die Konzentrationen nach einem standardisierten Schema (Anhang 11.7) erneut erniedrigt und wieder erhöht. Insgesamt wurden sieben Wendepunkte bestimmt. Der Mittelwert aus den letzten vier Wendepunkten ergab die individuelle Riechschwelle für jede Seite. Der Normwert für eine Normosmie wurde ab Stufe 6 ermittelt (Neumann et al., 2012) und war somit Schwellenuntergrenze dieser Studie.



Abbildung 8: Sniffin Sticks

Die Abb. zeigt einen Satz Sniffin Sticks zur Durchführung des standardisierten Riechtests bestehend aus 3 x 16 Stiften zur Bestimmung der Riechschwelle. Zur Verblindung der Probanden wurde die rote Schlafbrille verwendet.

4.3.4 fMRT

Bevor die fMRT-Untersuchung durchgeführt wurde, fand die Aufklärung der Probanden über mögliche Risiken an Hand eines standardisierten Aufklärungsbogens statt. Unmittelbar vor Beginn mussten alle Probanden am Körper befindliche Metallgegenstände ablegen. Anschließend erfolgte die Lagerung des Probanden und das Anlegen einer Kopfspule. Für die fMRT- Untersuchung wurde ein 3-Tesla-Magnetresonanzscanner (Magnetom Verio, Siemens) verwendet. Der Versuchsaufbau bestand aus vier verschiedenen Flaschen, die mit einem mobilen Olfaktometer (Sommer et al., 2012) über Teflonschläuche verbunden waren. Flasche 1 und 3 beinhalteten die Duftlösung PEA, wohingegen 2 und 4 mit der Kontrolllösung 1,2-Propanediol (PROP) gefüllt waren. Die Duftreize wurden vom Olfaktometer ebenfalls

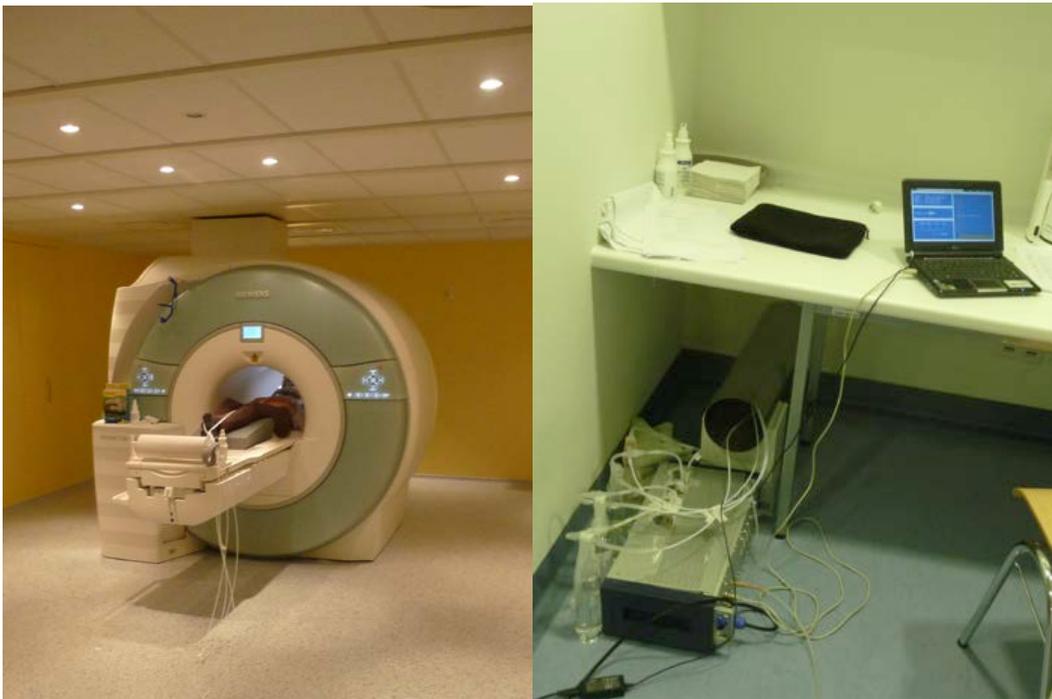


Abbildung 9: 3 Tesla- MRT (links), Olfaktometer mit Versuchsaufbau (rechts)

Die linke Abb. zeigt die Lagerung eines Probanden im MRT-Scanner. Von ihm ausgehend verlaufen die Duftschläuche, welche durch ein Rohr in der Wand in einen Nachbarraum verlegt wurden. Dort waren sie mit dem mobilen Olfaktometer verbunden. In 3 verschiedenen randomisierten Sequenzen wurden die Düfte verabreicht.

durch Teflonschläuche und entsprechende Nasenstücke zum Probanden geleitet. Der Versuch wurde nach einem standardisierten Blockdesign (Abb. 10) durchgeführt. Es bestand aus 12 Blöcken mit jeweils einem On- und einem Off-Block (je 20 sec=8 Scans). Die On-Blöcke waren alternierend in eine Sekunde mit und zwei Sekunden ohne Duftexposition aufgeteilt. So entstanden in jedem Durchgang (12 Blöcke * 16 Scans) 192 Bilder mit einer 2D GE-EPI Sequenz.

Insgesamt durchlief jeder Proband zwei Durchgänge mit insgesamt 24 Blöcken. Es existierten drei verschiedene Sequenzen mit einer randomisierten Reihenfolge von linken und rechten Stimuli. Nach jedem Durchlauf wurden die Probanden nach der empfundenen Intensität des Duftes befragt. Die Messungen begannen mit einer Shim-Sequenz, mit Hilfe derer das Magnetfeld exakt auf den Probanden ausgerichtet wurde. Im Anschluss wurden die funktionellen Aufnahmen unter Gabe von Duftreizen angefertigt. Die Sequenzen bestanden aus 38 axial aufgenommenen Schnitten (Matrix 128*128, Repetitionszeit (TR) 2500 ms/Echozeit (TE) 30 ms, Anregungswinkel (Flip Angel) 90°, Voxelgröße von (3*3*3 mm). Zuletzt wurde eine strukturelle T1-gewichtete Aufnahme als Referenzbild für die funktionellen Aufnahmen erstellt (3D IR/GR Sequenz: TR 2180 ms/TE 3.93 ms).

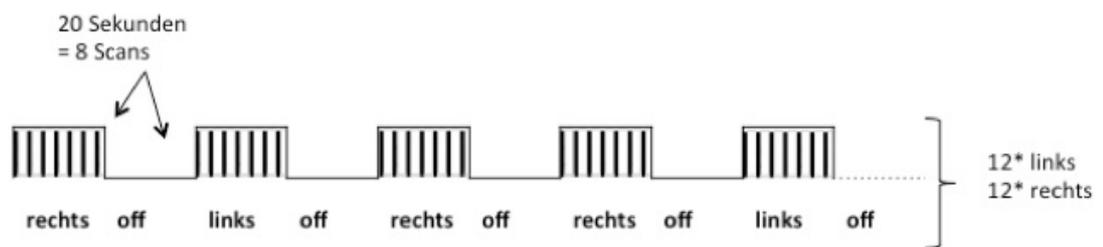


Abbildung 10: Blockdesign fMRT; Versuchsablauf

Schematische Darstellung des Blockes bestehend aus Duftpräsentation und Pause, aufgeteilt in 12 Blockwiederholungen rechts und 12 Blockwiederholungen links, randomisierte Reihenfolge

4.4 Düfte

In dieser Studie wurde ausschließlich die relativ spezifische olfaktorische Wahrnehmung und Lateralisierung von Gerüchen betrachtet. Aus diesem Grund wurde der Duft 2-Phenylethylalkohol (PEA, PCode:10127240, Aldrich Chemistry, Steinheim) verwendet. Dieser Duft wird von den meisten Menschen als angenehm wahrgenommen und als rosenartig beschrieben. Die Lösung des Duftes ist farblos, kann in geringen Konzentrationen augenreizend wirken und in höheren Konzentrationen zu Störungen des Nervensystems sowie des Magendarmtrakts führen. (Scognamiglio et al., 2012). Bei der fMRT-Untersuchung wurde PEA über das mobile Olfaktometer auf einen Volumenanteil von 30 Prozent verdünnt, um trigeminale Irritationen zu vermeiden (Porter et al., 2005; Frasnelli et al., 2011).

Als geruchsneutrale Kontrolllösung wurde sowohl beim Screeningtest als auch bei der fMRT-Untersuchung 1,2-Propanediol (PROP, PCode: 101231022, Aldrich Chemistry, Steinheim) verwendet.

4.5 Auswertung

4.5.1 Screeningtest und Intensitäten

Die statistische Auswertung des Screeningtests (Bewertungen, Alter, Geschlecht) wurde mit SPSS Version 20 (SPSS Inc., Chicago III., USA) durchgeführt. Um die im MRT bewerteten Intensitäten zu vergleichen, wurde ein t-Test für unabhängige Variablen verwendet. Der Signifikanzwert betrug $p < 0.05$.

4.5.2 fMRT

Die fMRT-Daten wurden mit Hilfe des Programmes SPM 8 (Statistical Parametric Mapping) in mehreren standardisierten Schritten auf der Oberfläche von Matlab R2013s ausgewertet. Zunächst wurde im Rahmen des Preprocessings (high pass Filter 128Hz) eine Bewegungskorrektur („Realignment“) durchgeführt. Die Daten wurden Nullpunkt korrigiert, wobei die Commissura anterior als Referenz diente. Anschließend wurde die sogenannte Coregistrierung durchgeführt. Alle Gehirnaufnahmen waren dadurch in Form und Größe einer Schablone angepasst und konnten in ihren unterschiedlichen Aktivierungen verglichen werden. Die Segmentierung diente der Zerlegung der Bilder in graue und weiße Substanz. Dadurch entstanden Negative, welche für die nachfolgende Normalisierung notwendig waren. Das Smoothing, auch Glätten der Daten, erfolgte mit Gaussian Kernel (8x8x8 FWHM). Der Output erfolgte im MNI- (Montreal Neurological Institute) System.

Nach dem Preprocessing wurde die statistische Auswertung in zwei Schritten durchgeführt. Die erste individuelle Statistik erfolgte für jeden Probanden einzeln. Hierbei wurden die Hirnaktivierungen des ON-Blocks (mit Duft) mit denen des OFF-Blocks (ohne Duft) mittels t-Test verglichen. Der Vergleich erfolgte seitengetreunt für links und rechts. Ein signifikanter Aktivierungsunterschied bestand erst bei einem p-Wert von 0,001.

Im anschließenden zweiten Schritt der Auswertung wurde eine Gruppenstatistik mit dem Vergleich der Gruppe L und Gruppe K durchgeführt. Es erfolgte eine Reihe von Vergleichen im „fullfactorial“ oder multifaktoriellen Design. Signifikante Aktivierungen wurden in Clustern angegeben. Ein Cluster ist eine Ansammlung von mehreren Voxeln. Die Cluster wurden ab einer Größe von sechs Voxeln und einer Schwelle von $p < 0,001$ (unkorrigiert) als signifikant bezeichnet und konnten somit in die Ergebnisse einfließen. Die Darstellung erfolgte zunächst im „glass brain“. Anschließend diente ein T1-gewichtetes Standardbild (single subject) dazu, alle Aktivierungen anschaulich darstellen zu können.

Um Aktivierungen darzustellen wurde eine Maske erstellt (AAL Atlas), die olfaktorisch bedeutsame Areale enthielt. Diese werden als region of interest (ROI) bezeichnet. Dazu gehören Amygdala, entorhinaler und piriformer Kortex, Hippocampus, Thalamus, Insula und orbitofrontaler Kortex. Außerdem wurden primäre Regionen, welche bei der intranasalen trigeminalen Wahrnehmung involviert sind (Mesencephalon, Pons) (Hummel et al., 2005; Boyle et al., 2007), einbezogen. Betrachtet wurden auch Areale, die bei dermalen Stimulation des Nervus trigeminus aktiv sind. Diese sind primärer und sekundärer somatosensorischer Kortex, sowie der Sulcus intraparietalis (Scheperjans et al., 2008).

Zur besseren Ortskodierung diente der "WFU Pickatlas 2.4". Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in tabellarischer Form (Tabelle 2: 11.2).

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Voruntersuchung

Die Probandengruppen Gruppe K und L wurden an Hand der Ergebnisse des Screeningtests eingeteilt. Gruppe K kam bei 20 Testhüben auf eine Trefferquote von 8 bis 13 richtigen Zuordnungen. Gruppe L erreichte bei 20 Testhüben 4 bzw. 15 bis 18 korrekte Zuordnungen.

Um eine beidseitige Normosmie auszuschließen, wurde der seitengetrennte Schwellentest mit Sniffing Sticks durchgeführt. Die Durchschnittsschwellen bei Gruppe L betragen für die linke Seite 9,7 und für die rechte Seite 9,3. Gruppe K erreichte links im Mittel 8,4 und rechts 8,4 Punkte. Es bestand damit kein signifikanter Unterschied weder zwischen den Seiten noch den Gruppen (Tabelle 1; 11.1).

5.2 Bewertung der Intensität der Düfte

Die Probanden waren während der Voruntersuchungen und der fMRT aufgefordert, die Duftstimuli bezüglich der empfundenen Intensität zu bewerten. Die Intensität des Duftes wurden von Gruppe L mit 6,7 (SD 1,6) und von Gruppe K mit 6,7 (1,5) bewertet. Es gab keinen signifikanten Unterschied, weder zwischen den Gruppen noch zwischen den Durchgängen, sodass ein Einfluss der Intensität auf die Stärke der Aktivierung ausgeschlossen werden kann.

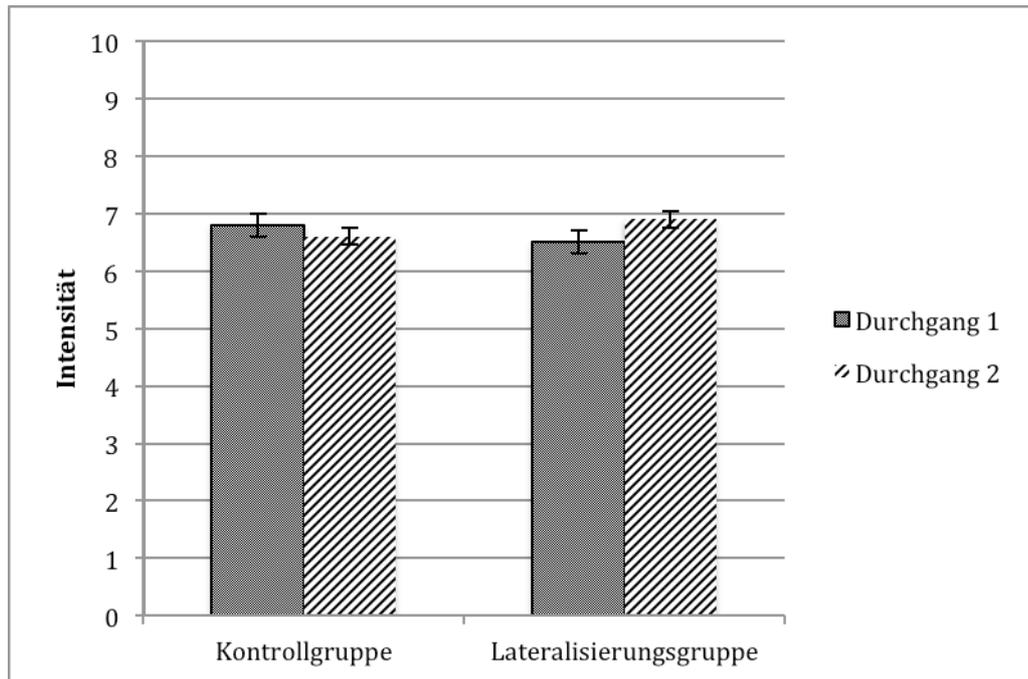


Abbildung 11: Bewertung Duftintensität beim fMRT

Diese Abb. zeigt die Bewertung der Duftintensität während der fMRT Untersuchung. Hierbei mussten die Probanden nach jedem Durchgang die Intensität auf einer Scala von 0-10 evaluieren. Zu sehen sind Mittelwert und Standardabweichungen, keine signifikanten Unterschiede.

5.3 Ergebnisse der fMRT-Untersuchung

Im Vergleich ON gegen OFF wurden in beiden Gruppen olfaktorisch relevante Hirnareale wie rechter und linker orbitofrontaler Kortex (OFC) und Insula aktiviert. Die Größe der Aktivierungen waren in beiden Gruppen vergleichbar. Der Vergleich der ROI-Aktivierungen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe L und Gruppe K (Abb. 12).

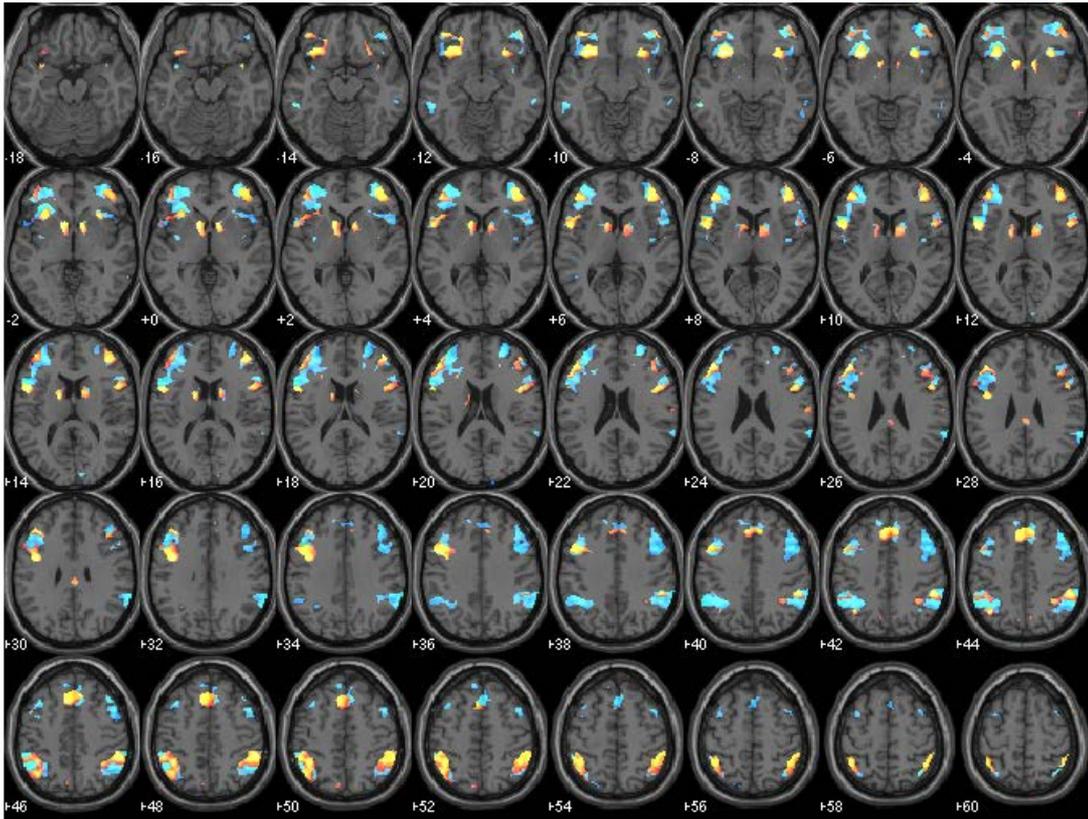


Abbildung 12: Übersicht der Aktivierungen im fMRT Gruppe L und K

Diese Abb. zeigt die Gesamtaktivierungen beider Gruppen bei Durchschichtung des Gehirns.

Relevante Areale sind OFC, Insula, Sulcus intraparietalis, Regio entorhinalis und Cingulum.

Gruppe K (blau) und Gruppe L (orange)

5.3.1 Kontrollgruppe

Die größte Aktivierung imponierte beim Vergleich von K-ON gegen -OFF im linken und rechten orbitofrontalen Kortex (OFC) mit einer Clustergröße von 324 bzw. 582 (34/46/-10, -46/46/-10). Außerdem zeigte sich eine Aktivierung der rechten Inselregion von 16 Voxeln (42, 26, -6) (Tabelle 2: 11.2). Es ergaben sich keinerlei Aktivierungen in trigeminalen ROI's. Ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Hemisphären bestand nicht.

5.3.2 Lateralisierungsgruppe

Auch in Gruppe L gab es deutliche Aktivierungen im rechten und linken OFC mit einer Clustergröße von 369 bzw. maximal 98 Voxeln (48/42/-8, -46/42/-16) und Insula (-32/22/-8, 32/22/-8). Interessanterweise zeigten die Lateralisierer außerdem Aktivierungen in trigeminalen Gebieten, wie dem linken und rechten S1 Areal mit einer Clustergröße von 71 bzw. 47 Voxeln (-42/-46/54, 48/-38/56), und dem linken und rechten Sulcus intraparietalis mit einer Clustergröße von 99 bzw. 249 Voxeln (-40/-50/50; 34/-50/42). Alle Aktivierungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

5.3.3 Vergleich der Gruppen

Im letzten Schritt der statistischen Auswertung erfolgte der direkte Vergleich der beiden Gruppen K vs. L bzw. L vs. K. Es zeigte sich bei der Bedingung K vs. L eine Mehraktivierung der rechten Insel mit einer Clustergröße von 60 Voxeln (38/-20/6, 34/-20/20). Aktivierungen in trigeminal typischen Hirnarealen gab es keine (Abb. 13).

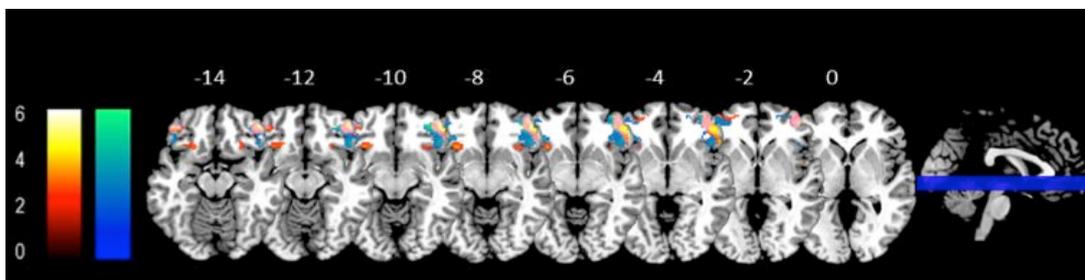


Abbildung 13: Aktivierungen olfaktorisch relevanter Areale

Diese Abb. zeigt die Aktivierung der olfaktorisch relevanten Areale (ROI) von Gruppe K (blau) und Gruppe L (rot). Für Visualisierungszwecke wurden Aktivitäten bei einer Schwelle von $p < 0.005$ gewählt, nicht korrigiert und in ein T1 gewichtetes Bild eingezeichnet. Verarbeitet mit dem Programm MRICron.

Im Vergleich L vs. K wurden signifikante Aktivierungen in trigeminalen Gebieten, wie dem intraparietalen Sulcus mit einer Clustergröße von 40 Voxeln (34/-50/42) und sogar unterschwellig in der S1- Region registriert (-40/-38/50). Weiterhin zeigten die Lateralisierer gegenüber der Kontrollgruppe eine Mehraktivierung im Bereich der Pons mit einer Clustergröße von 9 Voxeln (10/-24/-32). Dieser Bereich kennzeichnet den des Ncl. spinalis nervi trigemini. Das linke und rechte posteriore Cingulum war bei der Lateralisierungsgruppe mit einer Clustergröße von 6 bzw. 7 Voxeln (-4/-40/12, 8/-40/14) ebenfalls aktiv.

Wir erstellten nach den Koordinaten von Nash et al. (2009) eine ROI mit einem Umgebungsabstand von 6mm um den Ncl. principialis nervi trigemini. Die Lateralisierer zeigten signifikante Mehraktivierungen in diesem Areal. Der Zeitverlauf der Aktivierung zeigte, dass der Effekt durch eine Deaktivierung in der Kontrollgruppe erzeugt wird (Abb. 14: Kontrast fMRT Gruppe L vs. K).

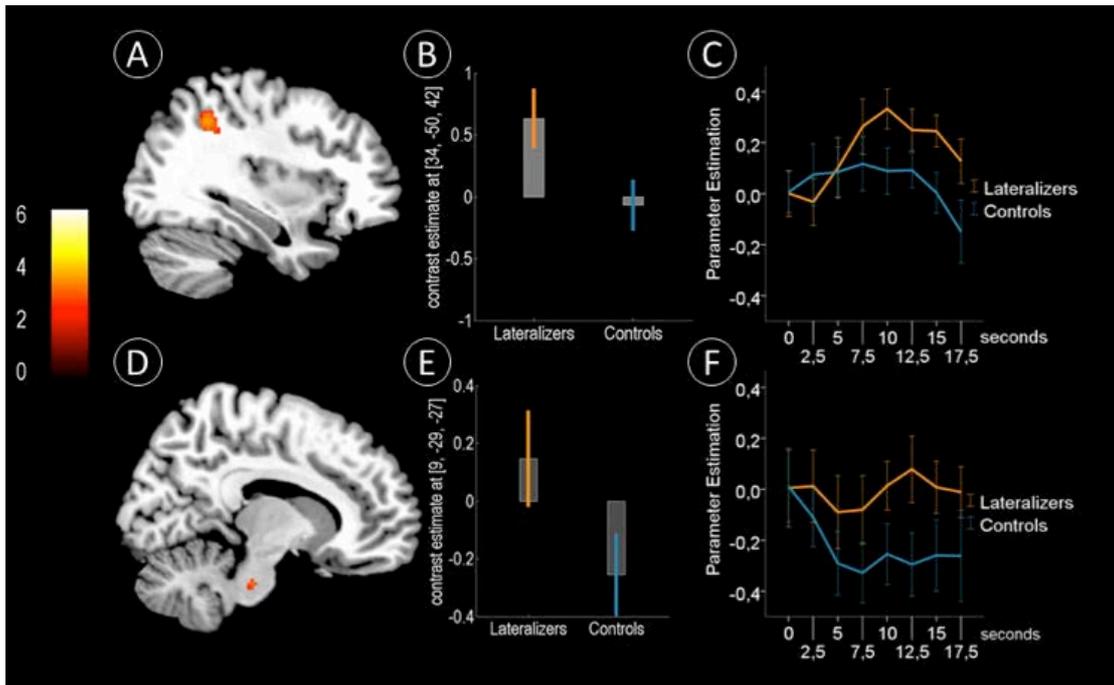


Abbildung 14: Kontrast fMRT Gruppe L vs. K

A) Lateralisierer zeigen eine signifikant höhere Aktivierung im rechten Sulcus intraparietalis. B und C) Darstellung von kontrast- und zeitabhängiger Aktivierung in dieser Region während der Präsentation mit PEA. D) Lateralisierer zeigen eine signifikant höhere Aktivierung im sensorischen Nucleus principalis nervi trigemini. Die Kontrollen zeigen eine signifikante Deaktivierung in diesem Bereich (E und F). Darstellung mit einer Schwelle von $p \leq 0,05$, T1 gewichtetes Bild, Programm MRICron.

6 Diskussion

6.1 Einflussfaktoren

Die Probanden mussten beim Screeningtest und nach jedem Durchgang der fMRT Untersuchung die empfundene Intensität des Stimulus von einer Scala von 0-10 evaluieren. Da Zusammensetzung und Konzentration (Hummel et al., 2003; Frasnelli and Hummel, 2005) der Duftstoffe die entscheidenden Faktoren für die Mitaktivierung des N. trigeminus sind, war die Wahl einer geeigneten wichtig. Die Ergebnisse zeigten, dass weder zwischen den Durchgängen noch zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Bewertung der Intensität der Düfte bestand. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass beide Gruppen die Stimuli bezüglich der Intensität gleich empfanden. Somit kann der Faktor Intensität als Ursache für die unterschiedlichen Aktivierungen im fMRT ausgeschlossen werden.

Cometto-Muñiz und Noriega (1985) beschreiben, dass Frauen sensibler auf hohe Duftkonzentrationen und beißende Reize reagieren. Dies könnte im Zusammenhang mit einer trigeminalen Mitaktivierung stehen. Auch Frasnelli et al. (2011) stellten fest, dass Frauen sensibler auf eine trigeminale Stimulation reagieren. Ein Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse wurde durch eine Gleichverteilung von männlichen und weiblichen Probanden innerhalb der beiden Gruppen ausgeschlossen.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den Geruchssinn und die trigeminale Wahrnehmung von Düften ist das Alter. Hummel et al. (2003) zeigten, dass sowohl die olfaktorische als auch die trigeminale Sensibilität mit steigendem Alter abnehmen. Mit der homogenen Altersstruktur der beiden Gruppen wurde dieser Einflussfaktor gezielt gering gehalten (Durchschnittsalter Gruppe L: $25,5 \pm 3,5$; Gruppe K: $25,9 \pm 1,9$ Jahre).

6.2 fMRT- Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass signifikante Unterschiede in der neuronalen Verarbeitung von Gerüchen zwischen Menschen mit und ohne Lateralisierungsfähigkeit bestehen.

Folgende Schlussfolgerungen lassen sich ziehen:

- 1) Es gibt die Fähigkeit, relativ spezifische olfaktorische Reize zu lateralisieren.
- 2) Die neuronale Verarbeitung von relativ spezifischen olfaktorischen Düften unterscheidet sich zwischen Lateralisierungs- und Kontrollgruppe.
- 3) Die unterschiedlich ausgeprägte Aktivierung des Nervus trigeminus durch olfaktorische Stimuli scheint dabei die entscheidende Rolle zu spielen.

Die Fähigkeit zu Lateralisieren, d.h. Düfte seitengetreunt wahrzunehmen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren behaupteten, dass das Lokalisieren von olfaktorischen Düften nicht möglich ist, wenn zu gleicher Zeit ein Duftimpuls in das eine und ein Neutralimpuls in das andere Nasenloch appliziert wird. Ein Intervall zwischen den Stimuli sei dafür notwendig (Radil and Wysocki, 1998). Andere Studien belegen dagegen, dass ein Lateralisieren von Düften möglich ist, was allerdings nur einem Teil der Menschen gelingt. Wir konnten mit Hilfe des Screeningtests (4.3.1) Personen mit Lateralisierungsfähigkeit identifizieren.

Als Ursache der Lateralisierbarkeit von Düften wird eine trigeminale Komponente diskutiert. Es beschäftigten sich mehrere Forschergruppen mit Düften, die von Menschen (Békésy, 1964; Porter et al., 2005) und Ratten (Rajan et al., 2006) als relativ spezifisch olfaktorisch wahrgenommen wurden und trotzdem den N. trigeminus aktivierten (Doty et al., 1978; Hummel and Kobal, 1992a; Yang et al., 2003). Auch Doty et al. (1978) beobachteten, dass sich die Lateralisierungswerte von Anosmikern und Normosmikern verbesserten, wenn diese von einer subjektiv erlebten "sensiblen Irritation" berichteten.

In der fMRT-Untersuchung konnten bei Gruppe L Aktivierungen des Sulcus intraparietalis nachgewiesen werden. Diese waren sowohl in der Einzelberechnung, als auch im Vergleich mit Gruppe K sichtbar. Es besteht die Hypothese, dass nur lateralisierter Aktivierungen im Sulcus intraparietalis haben, einer Region, die in zentrale Prozesse trigeminaler Stimulation eingebunden ist (J A Boyle et al., 2007; Frasnelli et al., 2012). Außerdem ist der Sulcus intraparietalis laut De Haan et al. (2014) auch bei der räumlichen Verarbeitung visueller Stimuli beteiligt. Unsere Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass dieses Hirnareal an der räumlichen Verarbeitung olfaktorischer Stimuli beteiligt ist.

Das trigeminale System reagiert sehr sensibel auf Reize. Schon geringe Konzentrationen reichen für die Wahrnehmung aus. In der fMRT-Untersuchung zeigten nur die lateralisierter Aktivierungen im primären somatosensorischen Kortex Area S1. Dies ist eine Region, die typischerweise nach sensibler Hautstimulation des Nervus trigeminus aktiviert wird, aber auch bei chemosensorisch trigeminaler Wahrnehmung eine Rolle spielt (Hummel et al., 2009; Savic et al., 2000).

Außerdem gab es im Vergleich von Gruppe L und Gruppe K signifikante Unterschiede in Pons und posterioem Cingulum. Dass diese bei der trigeminalen Verarbeitung eine Rolle spielen, beschreibt z.B. eine Studie von Boyle et al. (2007). Kerne des Nervus trigeminus, wie der Ncl. spinalis nervi trigemini, befinden sich genau in diesen pontinen Hirnarealen. Daher ist davon auszugehen, dass nicht nur die primär olfaktorischen Gebiete, sondern auch die trigeminalen an der relativ spezifischen olfaktorischen Verarbeitung beteiligt sind (Hummel et al., 2005). Eine Koaktivierung zwischen N. olfactorius und N. trigeminus scheint daher verantwortlich für die überdurchschnittlich hohen Ratingergebnisse von Gruppe L zu sein.

Neben der reinen Koaktivierung wird auch die Stärke der Aktivierung durch die trigeminale Komponente modifiziert. So zeigten Yousem et al. (1997), dass die Aktivierung im OFC (Brodmann Areal 11) durch relativ spezifische olfaktorische Düfte mit zunehmender Frequenz und Dauer der Stimuli abnehmen, da dies zur Gewöhnung führt. Verwendet man allerdings olfaktorisch-trigeminal kombinierte Düfte, so kommt es zu einem Aktivitätsanstieg um das 6-fache. Hierbei können

zusätzlich cinguläre, temporale, cerebelläre und occipitale Aktivierungen beobachtet werden.

Interessanterweise scheinen trigeminales und olfaktorisches System enger verknüpft zu sein, als trigeminales und somatosensorisches, die sogar beide Afferenzen des N. trigeminus sind. Vergleicht man PEA (olfaktorisch) mit Eukalyptus (olfaktorisch-trigeminal) und Luftstößen (somatosensorisch), kann man Korrelationen bei der Zuordnung von PEA und Eukalyptus beobachten. Bei Eukalyptus bzw. PEA und Luftstößen hingegen zeigte sich keine Korrelation (Frasnelli et al., 2010).

Betrachtet man ein anderes trigeminal aktives Areal, die Pons, fällt ein interessanter Unterschied zwischen beiden Gruppen auf. Zunächst sind Unterteilungen dieser Region anatomisch schwierig zu treffen, weshalb wir eine sehr hohe Auflösung der Darstellung wählen mussten, um die aktivierten Gebiete der Pons sichtbar machen zu können. Wir ließen die gewählten Koordinaten der fMRT- Auswertung mit den Ncll. principialis und spinalis nervi trigemini überlappen. Erst dadurch konnten wir die Unterschiede zwischen Gruppe L und Gruppe K sichtbar machen. In diesen sehr frühen Umschaltstationen zeigten die Kontrollen eine Deaktivierung der neuronalen Aktivitäten nach olfaktorischen Stimuli. Diese Deaktivierung des fMRT-Signals konnte in der Lateralisierungsgruppe nicht registriert werden und damit eine Erklärung dafür sein, dass olfaktorische Düfte von den Kontrollprobanden nicht lateralisiert werden können. Frühere Arbeiten zeigen, dass Düfte trigeminal vermittelte Sinneseindrücke verstärken (Kobal and Hummel, 1988), aber auch hemmen (Cain and Murphy, 1980) können. Die genauen Mechanismen sind nicht geklärt. Vermutet wird, dass Projektionen vom piriformen Kortex trigeminale Prozesse möglicherweise über inhibitorische Bahnen zu primär trigeminalen Gebieten beeinflussen. Bei der Duftverarbeitung sind dabei zwei Bahnen bekannt, eine direkte vom piriformen Kortex zum OFC und eine indirekte, welche zunächst über den Thalamus zieht. Aufmerksamkeit gegenüber einem Duft wird genau über diese indirekte transthalämische Bahn geleitet (Plailly et al., 2008). So ist eine mögliche Spekulation, dass diese Bahn bei Lateralisierern ausgeprägter ist.

PEA gilt als ein Beispiel eines relativ spezifischen olfaktorischen Duftes. Dass dieser trotzdem das Potential hat, trigeminale Bahnen zu aktivieren, wird in der aktuellen

Studie bewiesen. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass PEA kleine aber merkbare trigeminale Effekte erzeugen kann (Hummel and Kobal, 1992b). In einer anderen Studie von Doty et al. (1978) konnten vereinzelt anosmische Probanden PEA oder Vanille lokalisieren. Bei einer Verdünnung von PEA auf 30% ist belegt, dass jegliche Art von Irritation, Brennen oder Krabbeln eines olfaktorischen Duftes, die theoretisch auftreten können, nicht vorhanden sind (Doty et al., 1978; Hummel et al., 1991; Kobal et al., 1989). Trotzdem ist PEA in der Lage trigeminale Stimulationen auszulösen. Bei Anosmikern waren epitheliliale Potentiale auch während einer Androstenonapplikation ableitbar (Boyle et al., 2006). Die Probanden gaben keine bewusste Wahrnehmung an. Dennoch war eine trigeminale Aktivität präsent und an Hand von nasalen Mukosapotentialen ableitbar. Olfaktorische Reize können über afferente Bahnen in der Mukosa durch neurosekretorische Veränderungen Einfluss auf den N. trigeminus haben (Hummel and Livermore, 2002). Allerdings weisen Anosmiker eine höhere trigeminale Schwelle auf, können also z.B. Menthol schlechter lokalisieren (Hummel et al., 2003). Die spezifische Anosmie für Androstenon kann mit Hilfe einer wiederholten Exposition aufgehoben werden. Durch dieses Training sind die Probanden in der Lage, neben Intensität und Duftqualität vor allem trigeminale Irritationen wahrzunehmen (Wysocki et al., 1989). Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass trigeminale Wahrnehmung durch olfaktorische Rezeptoren gebahnt wird. Interessanterweise konnten Studien zeigen, dass der Erfolg beim Lateralisieren durch Nutzung der trigeminalen Komponente auf diese Art und Weise trainiert werden (Negoias et al., 2013).

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in olfaktorisch relevanten Arealen feststellen. Aktivierungsunterschiede können aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die fMRT-Methode in ihrem zeitlichen und räumlichen Auflösungsvermögen begrenzt ist. Eine technische Weiterentwicklung der Methode oder das Nutzen moderner Techniken, wie OERP-Studien (olfactory event-related potential), wären empfehlenswert (Lascano et al., 2010).

6.3 Ausblick

Bei *Drosophila melanogaster*, der Fruchtfliege, kann man beobachten, dass ihre Flugbahn von Düften beeinflusst wird. Hierbei wird eine der beiden Antennen stärker aktiviert. In den olfaktorischen Rezeptorneuronen sorgen Neurotransmitter für die Signalübertragung zwischen den Axonen. Diese sind in der Lage, morphologisch und funktionell unterschiedliche Zellen anzusteuern. Die ipsilaterale Hemisphäre wird stärker angesteuert als die kontralaterale und gibt somit den Ausschlag für die Flugrichtung (Gaudry et al., 2013). Hierzu gibt es ebenfalls Untersuchungen bei Ratten (Rajan et al., 2006) und Haien (Gardiner and Atema, 2010), die nachweisen, dass eine räumliche Orientierung durch bilateral wahrgenommene Düfte möglich ist. Eine solch evolutionäre Bedeutung scheint das Lokalisieren von Düften beim Menschen nicht darzustellen. In folgenden Studien sollte es das Ziel sein herauszufinden, ob die Fähigkeit zu lateralisieren eine Rolle spielt. Die Bedeutung für z.B. Sozialleben, Gedächtnis, Konzentrationsfähigkeit und die subjektive Rolle von Gerüchen im Alltag kann bis jetzt nur vermutet und sollte genauer untersucht werden. Die Hypothese, nach welcher die bilaterale Stimulation des olfaktorischen Systems das Gedächtnis signifikant mehr stimuliert, ist dabei ein ausschlaggebender Ansatzpunkt (Bromley and Doty, 1995).

Inokuchi vermutete Interaktionen der zwei chemosensorischen Systeme im Thalamus (Inokuchi et al., 1993). Aufmerksamkeit für Düfte wird genau über diese indirekte transthalämische Route definiert (Plailly et al., 2008). Es ist möglich, aber bleibt Spekulation, dass diese Route bei Lateralisierern ausgeprägter ist. Die Studienlage ist in Bezug auf die piriforme Aktivität sehr unterschiedlich. Die Diskrepanz ist dadurch zu erklären, dass längere Duftpräsentationen zur Gewöhnung führen (Sobel et al., 2000). Eine Untersuchung von Lateralisierern mit unterschiedlichen relativ spezifischen olfaktorischen Düften und unterschiedlichen Stimuluslängen könnte für weitere Klarheit sorgen. Eine weiterführende Studie könnte sich damit beschäftigen in wie weit ein Training dieser Fähigkeit möglich ist und ob neuronale Veränderungen nachweisbar sind.

Dazu kommt eine mögliche diagnostische Funktion. Bei Krankheiten wie Morbus Parkinson (Zucco et al., 2001) und Schizophrenie (Mohr et al., 2001) kann es zu einem hemisphärenbezogenen Beginn kommen. Dabei scheinen Lateralisierungen ein Frühzeichen zu sein. Dem seitengetrenten Testen der Riechfunktion würde damit eine wichtige diagnostische Funktion zukommen.

7 Zusammenfassung/ Summary

Im Tierreich scheint die Fähigkeit räumlich riechen zu können, d.h. Düfte zu lateralisieren, von evolutionärem Vorteil zu sein. So werden z.B. bei Ratten spezielle Nervenzellen im orbitofrontalen Kortex (OFC) stimuliert, welche eine unterschiedliche Verarbeitung generieren, je nachdem, ob eine Duftstimulation rechts, links oder beidseitig geschieht. Menschen sind nach bisherigem Kenntnisstand nicht in der Lage zu unterscheiden, in welches Nasenloch ein relativ spezifischer olfaktorischer Duft gegeben wurde. Allerdings besitzt ein kleiner Teil der Menschen die Fähigkeit, Düfte zu lateralisieren. Welchen zusätzlichen Nutzen diese Fähigkeit hat, ist noch nicht endgültig geklärt. Ziel dieser Studie war es, Unterschiede in der zentralnervösen Verarbeitung zwischen Menschen mit und ohne Lateralisierungsvermögen herauszustellen.

Mit einem speziellen Screening testeten wir 152 rechtshändige, freiwillige Probanden auf die Fähigkeit, olfaktorisch zu lateralisieren. Wir verwendeten PEA (Phenylethylalkohol) als relativ spezifischen olfaktorischen Duft und 1,2-Propanediol als geruchlose Kontrollflüssigkeit. Dabei konnten 19 Probanden identifiziert werden, die überdurchschnittlich gut dazu in der Lage waren. Diese Lateralisierungsgruppe und eine Kontrollgruppe (jeweils 15 Probanden, in Geschlecht und Alter vergleichbar) wurden mit Hilfe funktioneller Magnetresonanztomografie (fMRT) untersucht. Dazu wurde ein Blockdesign verwendet, in dem sich Duftapplikationen ins rechte und linke Nasenloch randomisiert abwechselten. Die Probanden waren außerdem dazu aufgefordert, die Intensität des Duftstoffes zu bewerten. Es konnten in beiden Gruppen Aktivitäten in olfaktorisch typischen Gehirnarealen wie dem OFC und Insula gefunden werden. Obwohl keiner der Lateralisierer eine trigeminale Reizung beschrieb, konnte in dieser Gruppe eine Mehraktivierung im trigeminalen System des Sulcus intraparietalis, in der Pons nahe des Nucleus spinalis nervi trigemini und des Tractus trigeminothalamicus posterior festgestellt werden. In der Kontrollgruppe konnte dagegen keine Aktivierung in diesen Bereichen und keine Mehraktivierung gegenüber den Lateralisierern gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das trigeminale System selbst bei relativ spezifischer olfaktorischer Stimulation einen Einfluss auf die Fähigkeit zu lateralisieren besitzt. Menschen sind durch das olfaktorische System allein nicht in der Lage, Düfte zu lokalisieren, unterscheiden sich aber im Maß der trigeminalen Koaktivierung durch olfaktorische Düfte.

Summary

For animals localizing odors seems to be of evolutionary importance. Rats are able to lateralize odors. This ability involves specialized neurons in the orbitofrontal cortex which are able to process left, right and bilateral presentation of stimuli. However, it is not clear whether this function is preserved in humans. Humans are in general not able to differentiate whether a selective olfactory stimulant has been applied to the left or right nostril; however exceptions have been reported.

Following screening of 152 individuals with an olfactory lateralization test, we identified 19 who could lateralize odors above chance level. These “lateralizers” underwent olfactory fMRI scanning in a block design and were compared to 16 controls matched for age and sex distribution. After excluding 5 subjects because of health reasons, two equal groups of each 15 subjects were formed. As a result, both groups showed comparable activation of olfactory eloquent brain areas. However, subjects with lateralization ability had significantly enhanced activation of the trigeminal pathway in the pons, approximately at the level of the spinal nucleus of the trigeminal nerve and at the position of the posterior trigeminothalamic tract, although none of the subjects reported a trigeminal percept like irritation, burning, or stinging. Taken together, this suggests that the trigeminal system was activated to a higher degree by the odorous stimuli in the group of “lateralizers”. We conclude that humans are not able to lateralize odors based on the olfactory input alone, but vary in the degree to which the trigeminal system is recruited by olfactory stimuli.

8 Literaturangaben

- Anton, F., Peppel, P., 1991. Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 41, 617–628.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., 2010. *Duale Reihe Anatomie*. Georg Thieme Verlag.
- Barnett, E.M., Evans, G.D., Sun, N., Perlman, S., Cassell, M.D., 1995. Anterograde tracing of trigeminal afferent pathways from the murine tooth pulp to cortex using herpes simplex virus type 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 2972–2984.
- Békésy, G. von, 1964. Olfactory analogue to directional hearing. *J. Appl. Physiol.* 19, 369–373.
- Bernard, J.F., Peschanski, M., Besson, J.M., 1989. A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neurosci. Lett.* 100, 83–88.
- Bouvet, J.F., Delaleu, J.C., Holley, A., 1988. The activity of olfactory receptor cells is affected by acetylcholine and substance P. *Neurosci. Res.* 5, 214–223.
- Bouvet, J.F., Delaleu, J.C., Holley, A., 1987. Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci. Lett.* 77, 181–186.
- Bouvet, J.F., Delaleu, J.C., Holley, A., 1984. [Electrical responses of frog olfactory mucosa to the administration of acetylcholine and substance P]. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* 298, 169–172.
- Boyle, J.A., Frasnelli, J., Gerber, J., Heinke, M., Hummel, T., 2007. Cross-modal integration of intranasal stimuli: a functional magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 149, 223–231. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.06.045
- Boyle, J.A., Heinke, M., Gerber, J., Frasnelli, J., Hummel, T., 2007. Cerebral activation to intranasal chemosensory trigeminal stimulation. *Chem. Senses* 32, 343–353. doi:10.1093/chemse/bjm004

- Boyle, J.A., Lundström, J.N., Knecht, M., Jones-Gotman, M., Schaal, B., Hummel, T., 2006. On the trigeminal percept of androstenone and its implications on the rate of specific anosmia. *J. Neurobiol.* 66, 1501–1510. doi:10.1002/neu.20294
- Brand, G., Millot, J.L., Saffaux, M., Morand-Villeneuve, N., 2002. Lateralization in human nasal chemoreception: differences in bilateral electrodermal responses related to olfactory and trigeminal stimuli. *Behav. Brain Res.* 133, 205–210. doi:10.1016/S0166-4328(01)00474-0
- Brodman, K., 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde.* Barth, Leipzig.
- Bromley, S.M., Doty, R.L., 1995. Odor recognition memory is better under bilateral than unilateral test conditions. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* 31, 25–40.
- Cain, W.S., Murphy, C.L., 1980. Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. *Nature* 284, 255–257.
- Cometto-Muñiz, J.E., Noriega, G., 1985. Gender differences in the perception of pungency. *Physiol. Behav.* 34, 385–389.
- Dalton, P., Doolittle, N., Breslin, P.A.S., 2002. Gender-specific induction of enhanced sensitivity to odors. *Nat. Neurosci.* 5, 199–200. doi:10.1038/nn803
- de Haan, B., Bither, M., Brauer, A., Karnath, H.-O., 2014. Neural Correlates of Spatial Attention and Target Detection in a Multi-target Environment. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991. doi:10.1093/cercor/bhu046
- Doty, R.L., Brugger, W.E., Jurs, P.C., Orndorff, M.A., Snyder, P.J., Lowry, L.D., 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* 20, 175–185.
- Doty, R.L., Kerr, K.-L., 2005. Episodic odor memory: influences of handedness, sex, and side of nose. *Neuropsychologia* 43, 1749–1753. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2005.02.007
- Engelhardt, W. von, 2009. *Physiologie der Haustiere.* Georg Thieme Verlag.

- Frasnelli, J., Charbonneau, G., Collignon, O., Lepore, F., 2009. Odor localization and sniffing. *Chem. Senses* 34, 139–144. doi:10.1093/chemse/bjn068
- Frasnelli, J., Hummel, T., 2005. Intranasal trigeminal thresholds in healthy subjects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 575–580. doi:10.1016/j.etap.2004.12.022
- Frasnelli, J., Hummel, T., Berg, J., Huang, G., Doty, R.L., 2011. Intranasal localizability of odorants: influence of stimulus volume. *Chem. Senses* 36, 405–410. doi:10.1093/chemse/bjr001
- Frasnelli, J., La Buissonnière Ariza, V., Collignon, O., Lepore, F., 2010. Localisation of unilateral nasal stimuli across sensory systems. *Neurosci. Lett.* 478, 102–106. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.074
- Frasnelli, J., Lundström, J.N., Schöpf, V., Negoias, S., Hummel, T., Lepore, F., 2012. Dual processing streams in chemosensory perception. *Front. Hum. Neurosci.* 6, 288. doi:10.3389/fnhum.2012.00288
- Frings, S., 2001. Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 510–519.
- Gardiner, J.M., Atema, J., 2010. The function of bilateral odor arrival time differences in olfactory orientation of sharks. *Curr. Biol. CB* 20, 1187–1191. doi:10.1016/j.cub.2010.04.053
- Gaudry, Q., Hong, E.J., Kain, J., de Bivort, B.L., Wilson, R.I., 2013. Asymmetric neurotransmitter release enables rapid odour lateralization in *Drosophila*. *Nature* 493, 424–428. doi:10.1038/nature11747
- Getchell, M.L., Bouvet, J.F., Finger, T.E., Holley, A., Getchell, T.V., 1989. Peptidergic regulation of secretory activity in amphibian olfactory mucosa: immunohistochemistry, neural stimulation, and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 256, 381–389.
- Gottfried, J.A., 2006. Smell: central nervous processing. *Adv. Otorhinolaryngol.* 63, 44–69. doi:10.1159/000093750

- Hummel, T., Doty, R.L., Yousem, D.M., 2005. Functional MRI of intranasal chemosensory trigeminal activation. *Chem. Senses* 30 Suppl 1, i205–206. doi:10.1093/chemse/bjh186
- Hummel, T., Futschik, T., Frasnelli, J., Hüttenbrink, K.-B., 2003. Effects of olfactory function, age, and gender on trigeminally mediated sensations: a study based on the lateralization of chemosensory stimuli. *Toxicol. Lett.* 140-141, 273–280.
- Hummel, T., Kobal, G., 1992a. Differences in human evoked potentials related to olfactory or trigeminal chemosensory activation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 84, 84–89.
- Hummel, T., Kobal, G., 1992b. Differences in human evoked potentials related to olfactory or trigeminal chemosensory activation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 84, 84–89.
- Hummel, T., Livermore, A., 2002. Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, 305–313. doi:10.1007/s00420-002-0315-7
- Hummel, T., Oehme, L., van den Hoff, J., Gerber, J., Heinke, M., Boyle, J.A., Beuthien-Baumann, B., 2009. PET-based investigation of cerebral activation following intranasal trigeminal stimulation. *Hum. Brain Mapp.* 30, 1100–1104. doi:10.1002/hbm.20573
- Hummel, T., Pietsch, H., Kobal, G., 1991. Kallmann's syndrome and chemosensory evoked potentials. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 248, 311–312.
- Hummel, T., Schiessl, C., Wendler, J., Kobal, G., 1996. Peripheral electrophysiological responses decrease in response to repetitive painful stimulation of the human nasal mucosa. *Neurosci. Lett.* 212, 37–40.
- Hummel, T., Welge-Lüssen, A., 2008a. Riech- und Schmeckstörungen: Physiologie, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. Georg Thieme Verlag.

- Hummel, T., Welge-Lüssen, A., 2008b. Riech- und Schmeckstörungen: Physiologie, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. Georg Thieme Verlag.
- Huttunen, J., Kobal, G., Kaukoranta, E., Hari, R., 1986. Cortical responses to painful CO₂ stimulation of nasal mucosa; a magnetoencephalographic study in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 64, 347–349.
- Inokuchi, A., Kimmelman, C.P., Snow, J.B., Jr, 1993. Convergence of olfactory and nasotrigeminal inputs and possible trigeminal contributions to olfactory responses in the rat thalamus. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 249, 473–477.
- Kettenmann, B., Hummel, C., Stefan, H., Kobal, G., 1996. Multichannel magnetoencephalographical recordings: separation of cortical responses to different chemical stimulation in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.* 46, 271–274.
- Kobal, G., Hummel, C., 1988. Cerebral chemosensory evoked potentials elicited by chemical stimulation of the human olfactory and respiratory nasal mucosa. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Potentials Sect.* 71, 241–250. doi:10.1016/0168-5597(88)90023-8
- Kobal, G., Klimek, L., Wolfensberger, M., Gudziol, H., Temmel, A., Owen, C.M., Seeber, H., Pauli, E., Hummel, T., 2000. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 257, 205–211.
- Kobal, G., Van Toller, S., Hummel, T., 1989. Is there directional smelling? *Experientia* 45, 130–132.
- Lascano, A.M., Hummel, T., Lacroix, J.-S., Landis, B.N., Michel, C.M., 2010. Spatio-temporal dynamics of olfactory processing in the human brain: an event-

- related source imaging study. *Neuroscience* 167, 700–708. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.013
- Lundström, J.N., Gordon, A.R., Wise, P., Frasnelli, J., 2012. Individual differences in the chemical senses: is there a common sensitivity? *Chem. Senses* 37, 371–378. doi:10.1093/chemse/bjr114
- Mohr, C., Röhrenbach, C.M., Laska, M., Brugger, P., 2001. Unilateral olfactory perception and magical ideation. *Schizophr. Res.* 47, 255–264.
- Nash, P.G., Macefield, V.G., Klineberg, I.J., Murray, G.M., Henderson, L.A., 2009. Differential activation of the human trigeminal nuclear complex by noxious and non-noxious orofacial stimulation. *Hum. Brain Mapp.* 30, 3772–3782. doi:10.1002/hbm.20805
- Negoias, S., Aszmann, O., Croy, I., Hummel, T., 2013. Localization of odors can be learned. *Chem. Senses* 38, 553–562. doi:10.1093/chemse/bjt026
- Neumann, C., Tsioulos, K., Merkonidis, C., Salam, M., Clark, A., Philpott, C., 2012. Validation study of the “Sniffin’ Sticks” olfactory test in a British population: a preliminary communication. *Clin. Otolaryngol. Off. J. ENT-UK Off. J. Neth. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. Cervico-Facial Surg.* 37, 23–27. doi:10.1111/j.1749-4486.2012.02431.x
- Ogawa, S., Menon, R.S., Tank, D.W., Kim, S.G., Merkle, H., Ellermann, J.M., Ugurbil, K., 1993. Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with a biophysical model. *Biophys. J.* 64, 803–812. doi:10.1016/S0006-3495(93)81441-3
- Plailly, J., Howard, J.D., Gitelman, D.R., Gottfried, J.A., 2008. Attention to odor modulates thalamocortical connectivity in the human brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5257–5267. doi:10.1523/JNEUROSCI.5607-07.2008
- Porter, J., Anand, T., Johnson, B., Khan, R.M., Sobel, N., 2005. Brain mechanisms for extracting spatial information from smell. *Neuron* 47, 581–592. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.028

- Radil, T., Wysocki, C.J., 1998. Spatiotemporal Masking in Pure Olfaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855, 641–644. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb10638.x
- Rajan, R., Clement, J.P., Bhalla, U.S., 2006. Rats Smell in Stereo. *Science* 311, 666–670. doi:10.1126/science.1122096
- Reiser, M., Kuhn, F.-P., Debus, J., 2011. *Duale Reihe Radiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Royet, J.P., Koenig, O., Gregoire, M.C., Cinotti, L., Lavenne, F., Le Bars, D., Costes, N., Vigouroux, M., Farget, V., Sicard, G., Holley, A., Mauguière, F., Comar, D., Froment, J.C., 1999. Functional anatomy of perceptual and semantic processing for odors. *J. Cogn. Neurosci.* 11, 94–109.
- Royet, J.-P., Plailly, J., 2004. Lateralization of Olfactory Processes. *Chem. Senses* 29, 731–745. doi:10.1093/chemse/bjh067
- Savic, I., Berglund, H., 2000. Right-nostril dominance in discrimination of unfamiliar, but not familiar, odours. *Chem. Senses* 25, 517–523.
- Savic, I., Gulyas, B., 2000. PET shows that odors are processed both ipsilaterally and contralaterally to the stimulated nostril. *Neuroreport* 11, 2861–2866.
- Savic, I., Gulyas, B., Larsson, M., Roland, P., 2000. Olfactory functions are mediated by parallel and hierarchical processing. *Neuron* 26, 735–745.
- Scheperjans, F., Hermann, K., Eickhoff, S.B., Amunts, K., Schleicher, A., Zilles, K., 2008. Observer-independent cytoarchitectonic mapping of the human superior parietal cortex. *Cereb. Cortex* N. Y. N 1991 18, 846–867. doi:10.1093/cercor/bhm116
- Scognamiglio, J., Jones, L., Letizia, C.S., Api, A.M., 2012. Fragrance material review on phenylethyl alcohol. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 50 Suppl 2, S224–239. doi:10.1016/j.fct.2011.10.028
- Shipley, M.T., Ennis, M., 1996. Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* 30, 123–176. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1<123::AID-NEU11>3.0.CO;2-N

- Silver, W.L., Mason, J.R., Marshall, D.A., Maruniak, J.A., 1985. Rat trigeminal, olfactory and taste responses after capsaicin desensitization. *Brain Res.* 333, 45–54.
- Skramlik, E.R. von, 1925. Über die Lokalisation der Empfindungen bei den niederen Sinnen. J.A. Barth.
- Sobel, N., Prabhakaran, V., Zhao, Z., Desmond, J.E., Glover, G.H., Sullivan, E.V., Gabrieli, J.D.E., 2000. Time Course of Odorant-Induced Activation in the Human Primary Olfactory Cortex. *J. Neurophysiol.* 83, 537–551.
- Sommer, J.U., Maboshe, W., Griebe, M., Heiser, C., Hörmann, K., Stuck, B.A., Hummel, T., 2012. A mobile olfactometer for fMRI-studies. *J. Neurosci. Methods* 209, 189–194. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.05.026
- Stone, H., Williams, B., Carregal, E.J., 1968. The role of the trigeminal nerve in olfaction. *Exp. Neurol.* 21, 11–19.
- Thuerauf, N., Gossler, A., Lunkenheimer, J., Lunkenheimer, B., Maihöfner, C., Bleich, S., Kornhuber, J., Markovic, K., Reulbach, U., 2008. Olfactory lateralization: odor intensity but not the hedonic estimation is lateralized. *Neurosci. Lett.* 438, 228–232. doi:10.1016/j.neulet.2008.04.038
- Wysocki, C.J., Dorries, K.M., Beauchamp, G.K., 1989. Ability to perceive androstenone can be acquired by ostensibly anosmic people. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7976–7978.
- Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.-B., Lee, C.-H., Lee, J.K., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B., 2003. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781–785. doi:10.1177/154405910308201004
- Yousem, D.M., Williams, S.C., Howard, R.O., Andrew, C., Simmons, A., Allin, M., Geckle, R.J., Suskind, D., Bullmore, E.T., Brammer, M.J., Doty, R.L., 1997. Functional MR imaging during odor stimulation: preliminary data. *Radiology* 204, 833–838. doi:10.1148/radiology.204.3.9280268
- Zatorre, R.J., Jones-Gotman, M., 1990. Right-nostril advantage for discrimination of odors. *Percept. Psychophys.* 47, 526–531.

Zucco, G., Zeni, M.T., Perrone, A., Piccolo, I., 2001. Olfactory sensitivity in early-stage Parkinson patients affected by more marked unilateral disorder. *Percept. Mot. Skills* 92, 894–898.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuronale Verarbeitung.....	3
Abbildung 2: Brodmann- Areale	5
Abbildung 3: "Bold Effect"	11
Abbildung 4: Probandenkollektiv	14
Abbildung 5: Testgerät Lateralisierung, Schlafbrille.....	16
Abbildung 6: Screeningtest mit Testgerät.....	17
Abbildung 7: Darstellung der Lateralisierungsscores.....	18
Abbildung 8: Sniffin Sticks	20
Abbildung 9: 3 Tesla- MRT (links), Olfaktometer mit Versuchsaufbau (rechts).....	21
Abbildung 10: Blockdesign fMRT; Versuchsablauf	22
Abbildung 11: Bewertung Duftintensität beim fMRT.....	27
Abbildung 12: Übersicht der Aktivierungen im fMRT Gruppe L und K.....	28
Abbildung 13: Aktivierungen olfaktorisch relevanter Areale	29
Abbildung 14: Kontrast fMRT Gruppe L vs. K.....	31

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Probandendaten und Testergebnisse	52
Tabelle 2: Übersicht der Aktivierungen im fMRT Gruppe L und Gruppe K	53

11 Anhang

11.1 Übersicht Probanden

				Olfaktorische Schwelle			
		Alter	Lateralisationstest	rechts	links	beste	
Kontrollgruppe	K1*	W	25	12	8.5	9.5	9.5
	K2	W	26	11	6.5	6.0	6.5
	K3	M	29	10	4.0	4.5	4.5
	K4	M	27	13	9.5	11.0	11.0
	K5	W	25	8	9.0	8.5	9.0
	K6	W	24	9	5.5	6.5	6.5
	K7	M	24	13	8.0	7.5	8.0
	K8	M	25	10	9.0	8.5	9.0
	K9	W	24	12	7.5	7.0	7.5
	K10	M	28	9	7.0	6.5	7.0
	K11	M	25	12	14.5	16.0	16.0
	K12	W	30	12	12.0	12.0	12.0
	K13	W	25	12	11.5	12.0	12.0
	K14	M	24	11	7.0	6.0	7.0
	K15	M	25	9	6.5	7.0	7.0
	K16	W	27	10	8.0	6.3	8.0
				<i>M</i>	8.4	8.4	8.7
				<i>SD</i>	2.5	2.9	2.9
Lateralisierer	L1	W	25	16	8.5	8.5	8.5
	L2	M	26	17	9.0	7.5	9.0
	L3*	M	27	4	5.5	6.5	6.5
	L4*	M	25	4	8.0	10.0	10.0
	L5	M	24	18	8.8	9.5	9.5
	L6*	W	28	16	10.3	10.0	10,25
	L7	M	23	17	7.5	9.3	9,25
	L8	W	24	15	6.5	8.0	8.0
	L9	W	26	17	10.5	11.5	11.5
	L10	W	22	16	10.0	12.0	12.0
	L11	W	23	18	11.5	12.0	12.0
	L12	W	24	15	6.5	8.5	8.5
	L13	W	27	18	10.5	11.0	11.0
	L14	W	22	16	11.0	9.5	11.0
	L15	M	26	18	9.5	10.0	10.0
	L16	M	25	17	12.5	10.5	12.5
	L17	M	29	17	11.5	12.5	12.5
	L18*	W	25	16	6.0	5.5	6.0
	L19	W	36	16	9.5	8.0	9.5
				<i>M</i>	9.3	9.7	10.3
				<i>SD</i>	1.9	1.6	1.6

Tabelle 1: Übersicht Probandendaten und Testergebnisse

*Beschreibung und Testergebnisse der Stichprobe. * Probanden, die aus der fMRT Studie ausgeschlossen wurden. Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) sind unter Ausschluss der mit * gekennzeichneten Probanden berechnet.*

11.2 Übersicht der Aktivierungen im fMRT

			Cluster- größe	T	MNI		
					x	y	z
Kontrollen (N=15)							
Olfaktorische Areale	Insula	rechts	16	3.24	42	26	-6
		OFC	rechts	582	4.98	34	46
		links	324	4.42	-46	46	-10
Trigeminale Areale		Keine überschwelligen Aktivierungen					
Lateralisierer (N=15)							
Olfaktorische Areale	Insula	links	34	3.56	-32	22	-8
		rechts	22	3.02	32	22	-8
	OFC	rechts	369	5.00	48	42	-8
		links	98	4.00	-46	42	-16
		links	23	3.43	-40	56	-2
Trigeminale Areale	S1	links	46	3.4	-32	22	-10
		links	71	3.66	-42	-46	54
	rechts	47	3.71	48	-38	56	
	Sulcus intraparietalis	rechts	249	4.31	34	-50	42
		links	99	4.57	-40	-50	50
verstärkte Aktivierungen der Kontrollen verglichen mit den Lateralisierern							
Olfaktorische Areale	Insula	rechts	60	3.60	38	-20	6
		rechts	9	3.07	34	-20	20
Trigeminale Areale		Keine überschwelligen Aktivierungen					
gesamtes Gehirn		Keine überschwelligen Aktivierungen					
verstärkte Aktivierungen der Lateralisierer verglichen mit den Kontrollen							
Olfaktorische Areale		Keine überschwelligen Aktivierungen					
Trigeminale Areale	Sulcus intraparietalis	rechts	40	3.53	34	-50	42
		Pons	rechts	9	3.23	10	-24
Gesamtes Gehirn	Cingulum posterior	links	6	3.40	-4	-40	12
		rechts	7	3.49	8	-40	14

Tabelle 2: Übersicht der Aktivierungen im fMRT Gruppe L und Gruppe K

11.3 Anamnesebogen

Anamnese	Nr.
-----------------	-----

Bestehen oder bestanden folgende **Krankheitsbilder**?

nein

ja, folgende

Unfall mit Kopfbeteiligung ?

häufige Erkältungen / Grippe /

Schnupfen?

häufige Nasennebenhöhlenentzündungen ?

Nasenpolypen ?

Heuschnupfen ?

behinderte Nasenatmung?

Kopfschmerzen ?

Nasenlaufen ?

verschleimter Rachen?

Schnarchen ?

Nerven/ Hirnerkrankung ?

Gelbsucht / Leberentzündung

(Hepatitis) ?

Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus)?

Nierenerkrankung ?

Schilddrüse **überfunktion** (Hyperthyreose)?

Schilddrüse **unterfunktion**

(Hypothyreose)?

Andere (welche).....

Sind Sie bereits im **Kopfbereich operiert** worden?

nein

ja, an

Nasennebenhöhlen wann ?

Nasenscheidewand wann ?

Nasenmuscheln wann ?

Gaumenmandeln wann ?

Rachenmandel ("Polypen") wann ?

Mittelohr rechts links wann ?

größte Zahnoperation wann ?

andere Operationen.....

Trinken Sie **Alkohol**?

- nein ja gelegentlich regelmäßig

Rauchen Sie?

- nein, noch nie
 nein, nicht mehr seitJahren..... ja seit Jahren

Nehmen Sie die **Pille**?

- nein, noch nie
 nein, nicht mehr seitJahren..... ja seit Jahren

Sind Sie Chemikalien / Stäuben / Gasen besonders ausgesetzt bzw. ausgesetzt
gewesen?

- nein, noch nie ja, gegenüber was ?.....

Wie beurteilen Sie Ihr **Riechvermögen** im Vergleich zu anderen?

- sehr gut -----
deutlich besser -----
etwas besser -----
normal -----
etwas schlechter -----
deutlich schlechter -----
sehr schlecht -----
keine Riechwahrnehmung -----

11.4 Anamnesebogen fMRT

FMRT	Nr.
------	-----

Kurzanamnese

Datum

<i>ja</i>	<i>nein</i>
-----------	-------------

Hat der Patient/Proband ausreichend lange geschlafen?

--	--

Hat der Patient/Proband am Vorabend alkoholische Getränke zu sich genommen?

--	--

Hat der Patient/Proband in den letzten beiden Stunden geraucht, gegessen oder etwas anderes als Wasser getrunken?

Trifft eines der Einschlusskriterien nicht zu bzw. trifft eines der Ausschlusskriterien zu?

--	--

Besonderheiten:

HNO-STATUS:

Ohren:
Nase:
Mund:
Larynx:

Name des Prüfarztes:

Unterschrift des Prüfarztes:

11.5 Händigkeitsfragebogen

Händigkeits-Fragebogen	Nr.
------------------------	-----

STUDENTITEL: Unterschiede in der Wahrnehmung der Lateralisierung von Duftstoffen in Abhängigkeit vom Trainingszustand des Probanden.

Händigkeits-Fragebogen

Bitte beschreiben Sie die unten genannten Aktivitäten ob Sie dazu stets die linke, meistens die linke, manchmal die linke oder rechte, meistens die rechte oder stets die rechte Hand benutzen. Bitte beantworten Sie jede Frage. Lassen Sie nur die Aktivität unbeantwortet die Sie überhaupt nicht beantworten können (keine Erfahrung haben).

	stets die linke	meistens die linke	manchmal die linke oder rechte	meistens die rechte	stets die rechte
	-2	-1	0	1	2
Schreiben					
Malen					
Werfen					
Schere					
Zahnbürste					
Fleisch mit Messer					
Löffel					
Fegen mit Besen					
Streichholz anzünden					
Schachtel öffnen					
GESAMTZAHL					

Ergebnis _____

Haben Sie linkshändige Geschwister? _____

Sind Sie ein „umgelernter Linkshänder“? _____

11.6 SDI Bogen

Riechtest- SDI: *Sniffin 'Sticks*

Datum: / / Uhrzeit: Untersucher:

Name: Vorname:

Geburtsdatum: / / Geschlecht: m / w

Ergebnis Schwelle:

	▲	▼	▲	▼	▲	▼	▲
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							