

**Die cerebrale Antwort
auf Duftstoffgemische mit unterschwelligen Komponenten
- eine fMRT- Studie**

Dissertationsschrift
zur Erlangung eines doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)
der Medizinischen Fakultät
Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Selda Olgun
aus Berlin

Dresden 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hummel
2. Gutachter:

Tag der Verteidigung:

gezeichnet: Prof. Dr. med.

Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	3
II Grundlagen	5
Grundlagen des Riechens	5
Duftklassen und Geruchsmodalitäten	11
Die funktionelle Magnetresonanztomographie	13
III Erwartungen und Hypothesen	19
IV Material und Methoden	20
IV.1 Ethische Aspekte	20
IV.2 Ablauf der Voruntersuchungen Tag- 1	20
IV.3 Verwendete Düfte	24
IV.4 Ablauf der fMRT- Untersuchung Tag- 2	24
IV.4.1 Anamnese und Riechtest	24
IV.4.2 Versuchsaufbau fMRT	25
IV.4.3 Versuchsdurchführung fMRT	27
IV.5 Datenauswertung	27
IV.5.1 Psychophysik	27
IV.5.2 fMRT	28
V Ergebnisse	29
V.1 Daten der psychophysischen Testung	29
V.1.1 Riechschwellerermittlung von Ambroxan	29
V.1.2 Riechschwellentestung von Phenylethylalkohol	30
V.1.3 Diskrimination von Geruchsgemischen	31
V.1.4 Beurteilung der Wahrnehmung im fMRT	31
V.2 Daten des funktionellen MRT	32
V.2.1 Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe	32
V.2.2 Kontraste der Hirnaktivierungen zwischen Sensitiv und Insensitiv	34
V.2.3 Kontrast beider Probandengruppen bei alleiniger Präsentation von Ambroxan	36
V.2.4 Vergleich zwischen ambroxanhaltigem Duft Mix und dem Duft ohne Ambroxan Henkel bei Sensitiven und Insensitiven	37

VI	Diskussion	40
VII	Literaturverzeichnis	43
VIII	Abbildungsverzeichnis	46
IX	Tabellenverzeichnis	48
X	Abkürzungsverzeichnis	49
XI	Eidesstattliche Erklärung	50
XII	Danksagung	51
XIII	Zusammenfassung der Dissertation in Deutsch	52
XIV	Zusammenfassung der Dissertation in Englisch	55

Einleitung

Die meisten Gerüche, denen wir im täglichen Leben begegnen, sind Mischungen von mehreren chemischen Substanzen. Während die cerebralen Antworten auf einzelne Duftstoffe verhältnismäßig gut im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte studiert wurden (z.B. (Gottfried et al., 2002; Savic et al., 2000; Sobel et al., 1998)), fehlen uns heute noch bedeutsame Informationen darüber, wie das Gehirn Duftstoffmischungen verarbeitet. In einer wegweisenden Veröffentlichung von Boyle et al. wurden die Gehirnaktivierungen bei Probanden nach einer PET (Positronen- Emissions- Tomographie) Untersuchung verglichen, die entweder mit reinen Duftstoffverbindungen oder binären Duftstoffgemischen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert wurden. Sie beobachteten, dass das Duftstoffgemisch den Gyrus Cingulus, den parietalen und den superioren frontalen Cortex zu einem größeren Umfang aktiviert hat, als die reinen Duftstoffverbindungen es taten. Des Weiteren berichteten sie darüber, dass durch die Stimulation mit binären Duftstoffgemischen in gleicher Konzentration der laterale orbitofrontale Cortex stärker aktiviert wurde und dass Duftstoffgemische mit einzelnen Komponenten in ungleicher Konzentration eine geringere Aktivierung bewirkten. Die geringste Gehirnaktivierung erfolgte durch die reinen Duftstoffverbindungen. Der anteriore orbitofrontale Cortex OFC wurde einerseits von den Duftstoffgemischen aktiviert und andererseits durch die reinen Duftstoffverbindungen deaktiviert (Boyle et al., 2009).

Obwohl also untersucht wurde, wie das Gehirn auf Gemische von Duftstoffen unterschiedlicher Konzentration und auf reine Duftstoffverbindungen reagiert, erklärt es nicht, wie wir Duftstoffmischungen wahrnehmen. Es wurde beschrieben, dass die Probanden nicht in der Lage dazu waren, auf Anrieb einen sehr vertrauten Geruch innerhalb eines Duftstoffgemisches aus 16 verschiedenen Gerüchen zu erkennen (Jinks und Laing, 1999). Die Autoren spekulierten, dass die Duftstoffe sich gegenseitig durch kompetitive Mechanismen an den olfaktorischen Rezeptorenzellen hemmen, womit der für die Geruchsidentifikation erforderliche räumliche Code verloren gegangen sein könnte (Jinks und Laing, 1999).

In dieser Studie wurde gezielt dieses Phänomen durch die Anwendung der funktionellen Magnetresonanztomographie untersucht, um die Gehirnaktivierungen von Probanden nach Stimulation mit Geruchsmischungen aufzuzeichnen. Die Probanden für diese Studie wurden so ausgewählt, dass bestimmte Komponenten des Duftstoffgemisches in beiden Probandengruppen nicht in derselben Art und Weise wahrgenommen wurden. Es ist bekannt, dass der Geruchssinn eine große Variabilität in der Bevölkerung aufweist. Sogar die einfachsten Aufgaben, wie zum Beispiel die Ermittlung der niedrigsten Konzentration

einen Geruch wahrzunehmen – die ermittelte Riechschwelle - offenbart große Unterschiede zwischen den Probanden. Zur Ermittlung der Riechschwellen für Androstadienone und Phenylethylalkohol für 100 gesunde junge Probanden sind über zwölf logarithmische Schritte oder vier Größenordnungen notwendig (Lundstrom et al., 2003). Des Weiteren haben die Autoren beobachtet, dass die Riechschwelle für Androstadienone bimodal verteilt wird. Die zwei Modi wurden durch eine 32- fache Steigerung der Konzentrationen getrennt. In Extremfällen einer bimodalen Verteilung für mehrere Gerüche kann eine große Prozentzahl der allgemeinen Bevölkerung diese überhaupt nicht wahrnehmen. Dies wird als spezifische Anosmie bezeichnet. Diese Gerüche schließen Androstadienone (Frasnelli et al., 2011; Keller et al., 2007) und Androstenone ein (Boyle et al., 2006; Keller et al., 2007). Es ist wert, sich die spezifische Anosmie im Gegensatz zu der allgemeinen Anosmie zu merken, bei der die Patienten definitionsgemäß Gerüche überhaupt nicht wahrnehmen und Probanden mit einer spezifischen Anosmie keine Schwierigkeiten beim Wahrnehmen anderer Gerüche haben. Die spezifische Anosmie bezieht sich wahrscheinlich auf genetische Faktoren (Keller et al., 2007), während die allgemeine Anosmie zum Beispiel durch Kopftraumata und Virusinfektionen verursacht wird (Temmel et al., 2002). Für diesen Versuch wurde die riesige Variabilität des Geruchsinns in der Bevölkerung ausgenutzt und die individuellen Unterschiede der Duftstoffgemischverarbeitung bei cerebraler Antwort auf einen Duftstoffreiz in zwei Gruppen von Probanden untersucht.

Trotz der Vielzahl der Studien auf diesem Gebiet sind viele Aspekte der unbewussten Wahrnehmung bisher noch nicht bekannt. So ist noch unklar in wieweit bei psychophysisch identischen olfaktorischen Fähigkeiten ein unterschiedliches cerebrales Aktivierungsmuster auftreten kann. Dies ist von besonderem Interesse bei Personen, die eine Insensitivität für spezifische Gerüche aufweisen. Die Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung dieser Frage dienen.

II Grundlagen

II.1 Grundlagen des Riechens

In der Nasenhöhle befindet sich unsere Riechspalte. Die Riechspalte reicht von dem oberen Nasengang bis zum Ansatz der mittleren Nasenmuschel und an den gegenüberliegenden Abschnitt des Nasenseptums und ist von der Riechschleimhaut ausgekleidet (Leopold et al. 2000, Lane et al. 2002). Die Riechschleimhaut besteht aus einem mehrreihigen olfaktorischen Epithel, welches mit zunehmendem Alter mosaikartig von respiratorischen und olfaktorisch- dysplastischen Arealen unterbrochen ist (Smith 1942, Kern 2000, Jafek et al. 2002) und der Lamina propria. Zum olfaktorischen Epithel zählen die Basalzellen, olfaktorische Rezeptorneurone und Stützzellen. Die Lamina propria enthält Bindegewebe, Blutgefäße, seröse Bowman- Drüsen, deren Ausführungsgänge das olfaktorische Epithel durchziehen und die für die Funktion des Riechens von Bedeutung sind sowie die Axone des sich ständig erneuernden olfaktorischen Rezeptorneurons. Die gebündelten Axone ziehen als Fila olfactoria durch die ein bis zwei mm großen Löcher der Lamina cribrosa des Os ethmoidale zur ersten zentralen Anlaufstation, dem Bulbus olfactorius und sind von gliaartigen Zellen, den sogenannten „Olfactory Ensheathing Cells“ (OEC) umgeben. Die OEC haben unter anderem die Funktion die erneuerten olfaktorischen Rezeptorneurone zum Bulbus olfactorius zu führen und sie an einer Fehlverschaltung zu hindern (Schwartz et al. 2000). Dieser Zelltyp führt ohne Unterbrechung von der Peripherie ins ZNS. Die Dendriten des olfaktorischen Rezeptorneurons reichen in den Nasenschleim und enthalten Auftreibungen. Von diesen Auftreibungen oder den sogenannten Dendritic Knobs erstrecken sich die unbeweglichen Zilien mit den Rezeptoren für Duftstoffe. Die Perikaryone der olfaktorischen Rezeptorneurone liegen im mittleren Bereich des Epithels (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1

Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels

Die Riechschleimhaut setzt sich aus Riechsinneszellen, Stützzellen, Basalzellen und Bowman-Drüsen zusammen. Am apikalen Ende der Riechsinneszellen befinden sich von Schleim umhüllte ziliäre Fortsätze. Jede Riechsinneszelle sendet ein Axon zu den Mitralzellen im Bulbus olfactorius. Periglomeruläre Zellen und Körnerzellen wirken inhibitorisch. Bahnen zum Gehirn sind rot dargestellt, Bahnen vom Gehirn blau dargestellt (modifiziert nach Schmidt et al., 2000; S.322)

In der Zellmembran der olfaktorischen Rezeptorneurone sitzen die olfaktorischen Rezeptorproteine. Diese Rezeptorproteine stellen die molekulare Grundlage des Riechens dar. Nach der Bindung eines Duftstoffes mit seinen verschiedenen Molekülen an verschiedene Rezeptoren bzw. die Bindung von verschiedenen Duftstoffen an denselben Rezeptortypen setzt eine Signalkaskade in Gang. Der chemische Impuls wird in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Interaktion führt zu einer Aktivierung des spezifisch-olfaktorischen G- Proteins und des Adenylylzyklase III- Enzyms. Dieses Enzym bildet das zyklische Adenosinmonophosphat cAMP als Botenstoff. Das zyklische Adenosinmonophosphat öffnet olfaktorische Kationenkanäle und ermöglicht den intrazellulären Natrium- und Calcium- Einstrom. Durch den Calcium- Einstrom wird letztlich auch ein calciumsensitiver Chloridkanal geöffnet und die Chloridionen strömen aus der Zelle. Das negative Membranpotenzial steigt von -70mV auf -50mV zum positiveren Schwellenpotenzial an. Wird das Schwellenpotenzial überschritten, folgt die Überführung des entsprechenden Sensorpotenzials in ein digitales Aktionspotential. Dieser Impuls wird axonal in den Bulbus olfactorius geleitet (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2

Vorgänge bei der G- Protein- aktivierten Signaltransduktionskaskade nach Bindung eines Duftstoffes an einen Rezeptor

AMP= Adenosinmonophosphat, ATP= Adenosintriphosphat, CAM= Calmodulin, cAMP= zyklisches Adenosinmonophosphat, CNG= Cyclic nucleotid gated, Golf= spezifisches olfaktorisches G- Protein, GTP= Guanosintriphosphat, PDE= Phosphodiesterase (modifiziert nach Hummel et al., 2008; S.19)

Der Bulbus olfactorius ist ein vorgelagerter Teil des Großhirns in dem die Mitral- und Büschelzellen als zweite Neurone der Riechbahn lokalisiert sind. Die apikalen Dendriten der Mitralzellen bilden Synapsen mit den Axonen der primären Sinneszellen. Diese synaptische Einheiten werden olfaktorische Glomeruli bezeichnet. Die olfaktorischen Glomeruli werden von den Axonen der Sinneszellen mit gleichem Rezeptorprotein und mit nur einem oder wenigen Mitralzellen gebildet. Die Axone der Mitralzellen bilden den Tractus olfactorius und die Axonkollateralen ziehen zu den Körnerzellen. Die Körnerzellen und periglomerulären Zellen bilden Synapsen mit den Dendriten der Mitralzellen und hemmen die Zellaktivität. Durch die Hemmprozesse werden weniger Sinneseindrücke zum Zentralnervensystem geleitet und der Riecheindruck kontrastiert. Die Kontrastbildung führt zu einer exakteren Geruchswahrnehmung. Die extrabulbär gelegenen Fasern der Mitralzellen führen zum olfaktorischen Cortex (siehe Abbildung 3).

rechte Hirnbasis des Menschen

Abbildung 3

Olfaktorische Projektionsgebiete von den Mitralzellen des Bulbus Olfactorius zu den zentralen olfaktorischen Instanzen

Über den Tractus olfactorius lateralis (LOT) zum piriformen (Pir) und entorhinalen (Ent) Cortex sowie zum Mandelkernkomplex (Amygdala, A) rot dargestellt. Von dort leiten Fasern olfaktorische Informationen zur Inselrinde (Ins) blau dargestellt und den orbitofrontalen Gyri (IOF= lateraler orbitofrontaler Gyrus, aOF= anteriorer orbitofrontaler Gyrus, mOF= medialer orbitofrontaler Gyrus). Die grün dargestellten Fasern projizieren zur Area perforata anterior (gepunktetes Viereck) und schließlich zum ventralen Striatum. Die weiße unterbrochene Linie zeigt die Projektion zum kontralateralen Bulbus über die vordere Kommissur. Der Nucleus olfactorius anterior (AON) befindet sich im Pedunculus olfactorius (OP); BO= Bulbus olfactorius, CM= Corpus mamillare, GR= Gyrus rectus, OT= Tractus opticus, Po= Pons) (modifiziert nach Hummel et al., 2008; S.23)

Entwicklungsgeschichtlich gehört der olfaktorische Cortex zum Paläo- bzw. Archicortex und liegt am basalen Vorderhirn. Die zum olfaktorischen Cortex gehörenden Strukturen: Der Nucleus olfactorius anterior (AON) als Massen von Nervenzellen, die hinter dem Bulbus olfactorius liegen. Der Einfluss des Nucleus olfactorius anterior bei der Verarbeitung von olfaktorischen Reizen ist unklar, jedoch ist er bei Morbus Parkinson betroffen. Der piriforme Cortex als eines der Hauptprojektionsgebiete olfaktorischer Reize, der vom Frontallappen in den Temporallappen übergeht, liegt nahe zu den orbitofrontalen Gyri und der Insel, bedeckt Areale der Amygdala und erstreckt sich bis zum mediobasalen Temporallappen. Die Regio periamygdalaris soll für die bewusste Wahrnehmung der Geruchsreize verantwortlich sein (Kahle; Frotscher 2001). Weil die Riechbahn als einziges sensorisches System nur zu einem geringen Teil im Thalamus umgeschaltet wird, wird der piriforme Cortex als primäre Riechrinde bezeichnet. Die Amygdala, der sogenannte Mandelkern, liegt lateral und unter dem piriformen Cortex. Die Fasern des Tractus olfactorius lateralis erreichen den Nucleus corticalis der Amygdala. Der entorhinaler Cortex als Fortsetzung des olfaktorischen Cortex und der Tractus olfactorius lateralis- Projektionen liegt am medialen Temporallappen. Die stärkste Projektion, neben den reziproken Fasern zum Bulbus olfactorius, führt zum Hippocampus. Die Fasern aus diesen Rindenarealen ziehen über den Thalamus zu Arealen des Neokortex, die man auch als sekundären olfaktorischen Cortex bezeichnet. Hier werden die Geruchsinformationen analysiert, interpretiert und erkannt. Hierzu zählen folgende Strukturen: Die Inselrinde als eine Übergangszone zwischen neokortikalem paläokortikalem Charakter. Agranuläre Bezirke der Inselrinde gelten als olfaktorisches Integrationszentrum mit anderen Modalitäten, wie zum Beispiel Schmecken. Der orbitofrontale Cortex ist der größte Projektionsort des olfaktorischen Cortex. Dieser erstreckt sich vom Gyrus rectus lateral bis zur Inselrinde und liegt dem Orbitadach auf (siehe Abbildung 4).

Rindengebiete

Abbildung 4

Zentrale olfaktorische Projektionen und Rindengebiete

Koronares MRT, T1- gewichtet, in Höhe der anterioren Kommissur (CA) weiß dargestellt. Der Tractus olfactorius lateralis (LOT) projiziert in den piriformen Cortes (Pir) und über Mandelkernanteile (A) in den entorhinalen Cortex (Ent). Zwischen dem Tractus olfactorius lateralis und unter dem Striatum (NC= Nucleus caudatus, Pu= Putamen) sowie dem Pallidum (Pa) breiten sich medial das ventrale Pallidum und lateral das ventrale Striatum aus (modifiziert nach Hummel et al., 2008; S.23)

Die Area praepiriformis, die Amydala, der entorhinaler Cortex sowie der Hippocampus, Anteile des Thalamus sowie der Gyrus cinguli gehören zum limbischen System. Das limbische System ist die Zusammenschließung von zentralnervösen Strukturen, die dicht miteinander funktionierend in Verbindung stehen (Kahle, Frotscher, 2001) und als Ursprungsort von Gefühlen, Trieben und hohen Leistungsvermögen angesehen werden (Trepel, 2003). Es kontrolliert angeborenes und erworbenes Verhalten (Silbernagel, Despopoulos, 2000) und entwickelt persönliche Emotionen (Aron, et al. 2005). Die grundlegenden Lebensvorgänge, wie die Selbst- und die Arterhaltung die von Lust- und Unlustgefühlen gefolgt sind, können im limbischen System ihre Entstehung haben. Das olfaktorische Zentrum ist durch mehrere Faserbündel mit dem limbischen System Verbunden. In der Amygdala enden die Fasern des Tractus olfactorius lateralis. Der Gyrus cinguli, auch als Gyrus limbicus bezeichnet, gab dem System seinen Namen und steht mit der Riechrinde, dem Hypothalamus, der orbitofrontalen Rinde und der Inselrinde in Verbindung (Kahle, Frotscher, 2001).

II.2 Duftklassen und Geruchsmodalitäten

Man weiß heute, dass der Mensch Tausende verschiedene Düfte (Buck und Axel, 1991) riechen und unterscheiden, sie sprachlich aber nicht annähernd benennen kann. Allgemein gültige Regeln für alle Geruchsqualitäten oder Geruchsklassen aufzustellen, gelang bisher nicht. Aus diesem Grund richtet man sich nach einer Einteilung des Geruchs in sieben Primärgerüche (Amoore, 1963). Amoore stellte eine Geruchstheorie auf, nach der es eine Korrelation zwischen dem Geruch und der dazugehörigen Molekülform zu geben schien. Tropfenartige Moleküle sollten einen minzigen Geruch hervorrufen, während kugelförmige Moleküle den Geruch des Kampfers verströmen. Winzige Veränderungen, wie zum Beispiel die Stellung von funktionellen Gruppen, könnten so zum Geruchsverlust von vorher stark riechenden Stoffen führen. Auch Enantiomere, also spiegelbildliche Darstellungen eines Molekülmodells, zeigten nach Amoores Theorie starke Unterschiede hinsichtlich ihrer Geruchsqualitäten auf. Doch seine Theorie bestätigte sich in den folgenden Jahren so nicht. Sein dahingehender Vorschlag zur Unterteilung des Geruchs in sieben Qualitätsklassen war: (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Klassifikation der Primärgerüche

Die Einteilung der Primärgerüche in Qualitätsklassen und die dazugehörigen biochemischen Verbindungen, modifiziert nach Amoore (1963) und Boeckh (1972).

Duftklasse	Riecht nach	Verbindungen
Blumig	Rosen	Geraniol
Ätherisch	Birnen	Benzylacetat
Moschusartig	Moschus	Moschus
Kampferartig	Eukalyptus	Cineol, Kampher
Faulig	faulen Eiern	Schwefel-Wasserstoff
Schweißig	Schweiß	Buttersäure
Stechend	Essig	Ameisensäure, Essigsäure

Diese in Tabelle 1 beschriebenen Leitdüfte werden als angenehm, andere als unangenehm bewertet. Diese subjektive Bewertung wird als Hedonik bezeichnet. Für einige Duftstoffe gilt sie zum Teil genetisch determiniert. Bei den meisten Düften erfolgt allerdings eine „Prägung“ durch die Erziehung oder durch die Situation, bei der als erstes ein bestimmter Geruch wahrgenommen wurde. Grundsätzlich muss ein Duftstoff bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften besitzen. Zum Beispiel gehören eine niedrige Polarität sowie eine hohe Oberflächenaktivität zu den Grundvoraussetzungen eines Duftstoffes. Damit man etwas riechen kann, muss ein stoffabhängiger Schwellenwert erreicht werden. Oft genügen sehr geringe Mengen an Duftstoffen. So reichen bei manchen Stoffen winzige Mengen von nur 10^7 Moleküle/cm³ aus, damit wir sie riechen können. Wenn wir sagen „Es riecht nach etwas!“, bezeichnet man diesen Zustand als Wahrnehmungs- oder Absolutschwelle (Riechschwelle). Wird ein Duft identifiziert, hat sich die Konzentration in der Luft erhöht und die Riechschwelle wurde überschritten.

II.3 Die funktionelle Magnetresonanztomographie

In der Medizin zählen die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT) und die Sonographie zu den fortschrittlichen Schnittbildverfahren. Im Gegensatz zum Röntgen oder zur Computertomographie werden bei der Magnetresonanztomographie keine ionisierenden Strahlen verwendet: Der Patient wird in das Zentrum eines starken Magnetfeldes geführt (Novelline, 2001). Der Magnetresonanztomograph besteht unter anderem aus folgenden Komponenten: dem Elektromagneten, dem Shimsystem, dem Gradientensystem, dem Hochfrequenzsystem und einem Computer (Pickuth, 2000) (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5

Der Magnetresonanztomograph (Sonata, Maestro Class, Siemens)

Universitätsklinikum Dresden

Die für die Magnetresonanztomographie verwendeten Magnetfeldstärken liegen etwa zwischen 0,2 und 3 Tesla. Ein Tesla entspricht 10.000 Gauss. Das Magnetfeld der Erde liegt bei 0,5 Gauss. Für Patienten mit Herzschrittmachern oder ähnlichen Biostimulatoren, Cochlearisimplantaten, orthopädischem Prothesenmaterial ist die Magnetresonanztomographie Untersuchung kontraindiziert. Es kann zur Erwärmung durch elektromagnetische Wechselwirkung kommen. Bei Patienten mit Tätowierungen im Untersuchungsgebiet könnte es zur Erhitzung der metallhaltigen Farbpigmente kommen und zu Hautverbrennung II. Grades führen. Bei Patienten mit Klaustrophobie wird die magnetresonanztomographische Untersuchung erschwert. Bislang sind negative Auswirkungen durch die Hochfrequenz- und Magnetfelder nicht bekannt (Lasserre, Blohm, 2003). Durch die Magnetresonanztomographie werden die Wasserstoffatomkerne in Fett- und Wassermolekülen hervorgehoben. Die Wasserstoffatomkerne ordnen sich am äußeren Magnetfeldrand an. Dem Patienten werden während eines Durchgangs hochfrequenzierte Impulse in einer festgelegten Frequenz zugeleitet. Die führt zu einer temporären Positionsänderung der Wasserstoffatomkerne aus ihrem Gefüge im äußeren Magnetfeldrand. Kurz darauf kehren die Wasserstoffatomkerne wieder in ihre Ausgangslage und senden dabei die absorbierten Radiofrequenzwellen als Signale zurück (Kernrelaxation). Ein elektromagnetisches Induktionsfeld ist dabei entstanden. Die wiederkehrenden Signale werden von einem Empfänger aufgenommen, zum Rechner übertragen, verarbeitet und zur Bilderstellung genutzt. Die Relaxationszeit ist die von den Wasserstoffatomkernen benötigte Zeit, um ihren Gleichgewichtszustand wiederherzustellen. Man unterscheidet zwischen longitudinaler und transversaler Relaxationszeit. Die longitudinale Relaxationszeit, auch als T1- Relaxationszeit bezeichnet ist 300 bis 2000 ms lang und die transversale Relaxationszeit, auch T2- Relaxationszeit genannt, ist 30 bis 150 ms lang. Die Bezeichnung der entstandenen Bilder als T1- bzw. T2- gewichtet ist abhängig von der für die Bilderstellung benötigten Zeit (Homebach et al. 2004). Die Repetitionszeit (TR) ist die Zeit, in der zur Bilderstellung bestimmte Hochfrequenz- Impulse wiederholt werden. Die Echozeit (TE) ist die Zeit bis zur Entstehung eines Echos nach dem ersten Hochfrequenz- Impuls.

Tabelle 2**Gewebeparameter und Signalintensitäten in der MRT**

Hell= signalreich, dunkel= signalarm, intermediär= ähnliche Signalintensität wie Gehirn, Echozeit (TE), Repetitionszeit (TR). (Auszug aus: Edelmann, R. R., Hesselink, J.R.: Clinical magnetic resonance imaging) WB Saunders Company, Philadelphia 1995)

	T1- gewichtete Bilder	T2- Gewichtete Bilder
TE	Kurz	länger
TR	Kurz	länger
Fett	sehr hell	Intermediär bis dunkel
Muskel	Dunkel	dunkel
Liquor cerebrospinalis	Dunkel	sehr hell
Weißer Substanz	Hell	leicht dunkel
Graue Substanz	leicht dunkel	leicht hell
Knochen (Kortikalis)	sehr dunkel	sehr dunkel

Bei der Bildentstehung werden unterschiedliche Sequenzen differenziert: Spin- Echo- Sequenzen, Turbo- oder Fast- Spin- Echo- Sequenzen und Gradienten- Echo- Sequenzen. Der Grund für die Farbgestaltung der Gewebe auf den jeweiligen Bildern (schwarz, weiß, und grau) sind die von den verschiedenartigen Geweben zurückgeleiteten Signale (siehe Tabelle 2). In Magnetresonanzbildern erkennt man Gewebe mit einer hohen Signalintensität als weiße Bereiche und Gewebe mit einer schwachen oder fehlenden Signalintensität erscheinen schwarz. Die Magnetresonanztomographie kann die Bilder in frontaler, transversaler und sagittaler Schichtebene darstellen. Unter anderem ist eine bessere Gewebedifferenzierung der Weichgewebsstrukturen als mit der Computertomographie möglich, jedoch ist die Messzeit länger. Die Messzeit bei einer Magnetresonanztomographie beträgt je nach Körperabschnitt und gewünschter Detailauflösung etwa 20 bis 30 Minuten. Die zeitaufwendige Messung führt zu einer Zunahme von Bewegungsartefakten. Im Vergleich dazu dauert die Computertomographie nur etwa fünf bis zehn Minuten.

Die hämodynamischen Prozesse im Gehirn bilden die Grundlage zur Unterscheidung von aktiven und weniger aktiven Hirnarealen im funktionellen MRT (fMRT). Das menschliche Gehirn, als die Steuerzentrale des gesamten Körpers, verbraucht etwa 20 Prozent am Gesamtsauerstoff des Körpers und etwa 15 Prozent am Gesamtblutfluss (Silbernagel, Despopoulos, 2000). Durch Aktivierungen von Hirnarealen werden die Neuronen depolarisiert. Zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials wird Energie und Sauerstoff benötigt. Der cerebrale Blutfluss (rCBF) passt sich den metabolischen Ansprüchen der Hirnareale an. Durch Aktivierung der Hirnareale nimmt der cerebrale Blutfluss entsprechend zum wirklichen Bedarf an Sauerstoff und Glukose überproportional zu (Ingvar, Risberg, 1965). Zu beobachten ist bei neuronaler Aktivität eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs um ca. fünf Prozent und des regionalen cerebralen Blutflusses um etwa 30 bis 50 Prozent (Roy, Sherrington). Die funktionelle Magnetresonanztomographie basiert auf dem BOLD- Effekt (Blood Oxygenation Level Dependent). Der Oxygenierungsgrad des Blutes wird als „physiologisches Kontrastmittel“ genutzt, um indirekt die neuronale Aktivität zu zeigen (Ogawa, et al. 1990; Turner et al. 1993). Das Sauerstofftransportprotein im Blut ist das Hämoglobin. Bindet das Hämoglobin keinen Sauerstoff, liegt es im desoxygenierten Zustand vor. Bindet das Hämoglobin Sauerstoff, liegt es im oxygenierten Zustand vor (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6

Desoxyhämoglobin und Oxyhämoglobin

Bei Sauerstoff- Bindung werden die Aminosäuren Tyrosin (Tyr) und Arginin (Arg) in eine neue Position verlagert (modifiziert nach Scharl, M., Gessler, M., von Eckardstein, A.: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Urban& Fischer Verlag, München 2009; S.769)

Im Magnetfeld haben das Oxy- und Desoxyhämoglobin verschiedene Charakteristika. Das Signal im Magnetresonanzbild wird durch das diamagnetische Oxyhämoglobin verstärkt. Das paramagnetische Desoxyhämoglobin dagegen schwächt das Signal und es kommt zur Störung der magnetischen Flussdichte in Gefäßen mit sauerstoffarmen Blut (Klose et al. 1999). Durch einen Stimulus wird der Metabolismus in Kortexarealen verstärkt und der cerebrale Blutfluss gesteigert. Es kommt zur Abweichung der Zusammensetzung von oxygeniertem zu desoxygeniertem Blut. Die Konzentration an Oxyhämoglobin im Blut steigert sich und das Signal im T2- gewichteten funktionellen Magnetresonanzbild wird verstärkt (Kwong et al. 1992).

Durch den Vergleich der Bilder von stimuliertem Zustand und Ruhezustand werden aktivierte Hirnareale ermittelt. Die Zeitspanne des BOLD- Effekts verläuft sehr charakteristisch (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7

Zeitlicher Verlauf des BOLD- Effektes

Die X- Achse stellt die Zeit (t) in Sekunden dar, die Y- Achse den Anstieg des Sauerstoffverbrauches in %. Nach Eintreffen eines Reizes vergeht eine Latenzzeit von ein bis zwei Sekunden bis es zum lokalen Sauerstoffverbrauch kommt. Vier bis sechs Sekunden nach dem Reiz tritt das Maximum des BOLD- Effektes ein. Bis zur Rückkehr des lokalen Sauerstoffverbrauchs auf Ruheniveau vergehen ab dem Reiz zehn bis zwölf Sekunden (modifiziert nach <http://www.fmri-easy.de/fmri.htm>)

Durch den erfolgten Reiz reagieren die Neuronen mit einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials und einer Aktivierung von bestimmten Hirnarealen. Durch den Bedarf an Glukose und Sauerstoff für diese Reaktion wird der regionale cerebrale Blutfluss gesteigert, allerdings läuft es zeitlich versetzt mit einer Latenz von ein bis zwei Sekunden ab (Ogawa et al. 1990). Erst vier bis sechs Sekunden nach Aktivierung folgt das Maximum des BOLD- Effekts (Rosen et al. 1998). Der Zeitabstand für Reiz und Reizpause sollten genügend groß gewählt werden.

III Erwartungen und Hypothesen

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob ein bestimmter Duftstoff bei Darbietung innerhalb eines Gemisches eine Reaktion des Gehirns hervorrufen kann, auch wenn die Probanden nicht in der Lage dazu waren, die Duftstoffgemische in An- oder Abwesenheit eines bestimmten Duftstoffes, voneinander zu unterscheiden.

Zur Einschätzung der allgemeinen olfaktorischen Funktion erfolgte für alle Studienteilnehmer eine Riechtestung mit standardisierten Riechstiften. Zur Ermittlung von zwei Probandengruppen wurde ein Riechschwellentest mit dem Duftstoff Ambroxan durchgeführt. Eine Gruppe der Probanden war unempfindlich (insensitiv= INS) auf den Duftstoff Ambroxan, während die andere Gruppe empfindlich (sensitiv= SEN) auf diesen gleichen Duftstoff war. Im fMRT wurden beide Gruppen mit dem einzelnen Duftstoff Ambroxan (AMB), einem komplizierten Duftstoffgemisch von mehreren Duftstoffen (HEN) und einem Duftstoffgemisch (MIX) der AMB und HEN enthält, stimuliert. Die Probanden wurden zu den dargebotenen Gerüchen während der fMRT Messung befragt. Dafür wurde der Duftstoff AMB in einer Konzentration verwendet, die über der ermittelten Riechschwelle der sensitiven Probandengruppe (SEN) und unter der ermittelten Riechschwelle der insensitiven Probandengruppe (INS) lag.

Es wurden für diese Studie mehrere Hypothesen aufgestellt:

Erstens wurde erwartet, dass der Duftstoff AMB olfaktorische Antworten in der sensitiven Probandengruppe, nicht aber in der insensitiven Probandengruppe aktivieren würde. **Zweitens** wurde angenommen, dass das Duftstoffgemisch HEN ähnliche Gehirnaktivierungsmuster in beiden Probandengruppen hervorrufen würde. **Drittens** wurde erwartet, dass im Vergleich der Duftstoffgemische HEN und MIX größere Aktivierungen in der SEN Gruppe als in der INS Gruppe hervorrufen würde.

IV Material und Methoden

IV.1 Ethische Aspekte

Zu Beginn der Einführungssitzung wurden alle teilnehmenden Probanden eingehend über die Studie und ihren Verlauf informiert und gaben anschließend ihr mündliches und schriftliches Einverständnis. Alle Probanden nahmen freiwillig teil, waren mit der wissenschaftlichen Auswertung ihrer Daten einverstanden und konnten jederzeit ohne Angabe von Gründen vorzeitig aus der Studie austreten. Jeder Studienteilnehmer erhielt eine Aufwandsentschädigung. Diese Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki über ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen durchgeführt. Sie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden positiv beurteilt (EK- Nummer: 40022009). Diese Studie wurde finanziell von der Firma Henkel unterstützt.

IV.2 Ablauf der Voruntersuchungen- Tag 1

Probandenauswahl: An der Studie nahmen gesunde Frauen und Männer im Alter von 18 und 40 Jahren teil, die ein normales Riechvermögen besaßen und rechtshändig waren. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, gesundheitliche Beeinträchtigungen, die mit Störungen der Riechfunktion einhergehen können wie zum Beispiel M. Parkinson oder Niereninsuffizienz, akute oder chronische Entzündungen der Nase und Nasennebenhöhlen sowie Vor- bzw. Begleiterkrankungen im Hals- Nasen- Ohren-Bereich. Alle ausgewählten Probanden sollten sich einer fMRT- Untersuchung unterziehen und durften daher keine Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen oder sonstige Metallteile im Körper haben. Außerdem von der fMRT Untersuchung ausgeschlossen waren Probanden mit Klaustrophobie, großflächigen Tätowierungen oder Piercings im Untersuchungsgebiet. Einschlusskriterien für alle Probanden waren das Alter von 18 bis 40 Jahren, die Gesundheit, ein normales Riechvermögen im „Sniffin‘ Sticks“ Identifikationstest und eine Rechtshändigkeit im Rechtshändigkeits- Testfragebogen aufwiesen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3***Einschluss- und Ausschlusskriterien***

Ausschlusskriterien	Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none">¾ Schwangerschaft¾ Gesundheitliche Beeinträchtigungen mit Störungen der Riechfunktion¾ Entzündungen der Nase und Nasennebenhöhlen , Vorerkrankungen im Hals- Nasen- Ohren- Bereich¾ Klaustrophobie¾ großflächige Tätowierungen und Piercings im Untersuchungsgebiet, Herzschrittmacher, künstliche Herzklappe oder sonstigem Metall im Körper	<ul style="list-style-type: none">¾ gesunde Probanden im Alter zwischen 18 und 40 Jahren¾ normales Riechvermögen¾ Rechtshändigkeit

Sniffin` Sticks: Nachdem alle Probanden den Riechtest- Fragebogen mit ihrer Selbsteinschätzung des Riechvermögens und der Nasendurchgängigkeit beantwortet hatten, folgte der standardisierte Identifikationstest mit 16 „Sniffin` Sticks“ (Hummel et al. 1997; Kobal et al. 2000). Diese standardisierten Riechstifte mit Gerüchen aus dem täglichen Leben, wurden im Abstand von etwa 30 Sekunden in vorgegebener Reihenfolge konsekutiv den Probanden dargeboten (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8

„Sniffin` Sticks“

16 Riechstifte mit Heft

Die Stiftspitze wurde zwei bis drei Zentimeter mittig vor beide Nasenlöcher gehalten. Jeder Stift wurde zusammen mit einer Liste von jeweils vier Antwortmöglichkeiten präsentiert. Die Probanden mussten sich für eine von vier Antwortmöglichkeiten entscheiden.

Als Voraussetzung für die weitere Teilnahme an der Studie mussten mindestens zwölf Items des Identifikationstests erkannt werden. Dieser Riechtest stellte sicher, dass die Studienteilnehmer ein normales Riechvermögen besaßen und somit das Einschlusskriterium erfüllten.

Schwellentest mit dem Duftstoff Ambroxan: Zur Unterscheidung der insensitiven Probanden auf Ambroxan von den sensitiven wurde ein Schwellentest mit dem Duftstoff Ambroxan durchgeführt. Der Duftstoff wurde in Propylenglykol gelöst und in verschiedenen Konzentrationsstufen aufgestellt. Die Verdünnungsstufen lagen zwischen 1: 10¹ und 1: 10⁷ für Ambroxan in Propylenglykol. Als neutralriechender Kontrollduft wurde Propylenglykol verwendet. Nun folgte die Schwellentestung mit Ambroxan in verschiedenen Konzentrationen und dem Kontrollduft Propylenglykol. Die Studienteilnehmer mussten bei verbundenen Augen die Flasche mit dem Duftstoff von dem Kontrollduft unterscheiden. Nacheinander wurden den Probanden die zwei Flaschen ungefähr drei Zentimeter mittig vor beide Nasenlöcher gehalten und hin und her geschwenkt. Begonnen wurde mit der niedrigsten Konzentrationsstufe. Die Konzentration wurde gesteigert bis die Probanden Ambroxan dreimal konsekutiv von dem Kontrollduft unterscheiden konnten. Als insensitiv (INS) auf Ambroxan galten die Teilnehmer mit einer Wahrnehmung des Duftes ab der Verdünnungsstufe von 1: 10² und als sensitiv (SEN) bei den Verdünnungsstufen von 1: 10⁷ bis 1: 10⁴. Die Auswahl der SEN Gruppe diente der Kontrollgruppengründung.

Das Durchschnittsalter aller Studienteilnehmer lag bei 24,7 Jahren (SD ± 2,1 Jahre). Die jüngsten Teilnehmer waren 19 Jahre und der älteste Studienteilnehmer 36 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der insensitiven Gruppe (INS) lag bei 23,2 Jahren (SD ± 7,1). Die teilnehmende INS Gruppe war zwischen 19 und 30 Jahren alt. Das Durchschnittsalter der SEN Gruppe lag bei 26,2 Jahren (SD ± 11,3). Die teilnehmenden sensitiven Probanden als Kontrollgruppe waren zwischen 20 und 36 Jahren alt.

Für die fMRT Studie wurden insgesamt 20 Probanden ausgewählt, zehn INS Probanden auf den Duftstoff Ambroxan und zehn SEN Probanden als Kontrollgruppe. Folglich wurden insgesamt 19 Probanden in die Analyse der fMRT Daten eingeschlossen. Die Daten von einem Probanden waren aufgrund von Artefakten nicht auswertbar.

IV.3 Verwendete Düfte

Der für diese Studie verwendete nahezu geruchlose Kontrollduft ist Propylenglykol (PG) in 100% von der Firma Sigma- Aldrich, Hauptsitz in St. Louis, USA. Der von der Firma Henkel, Hauptsitz in Düsseldorf, gestellte Duft in 0,05%iger Konzentration gelöst in PG war eine Mischung aus: 20% Citronellol, 20% Geraniol, 20% 2- Phenylethanol, 1- 5% Ethanon: (1- (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8- Octahydro- 2, 3, 8, 8- tetramethyl- 2- naphthyl) ethan- 1- on), 0,1- 1% Nerol, 0,1- 1% und 0,1- 1% Eugenol. In dieser Studie wurde dieser Duft Henkel (HEN) genannt. Auch der Duftstoff Ambroxan (AMB) in 0,125%iger Konzentration gelöst in PG wurde von der Firma Henkel gestellt. Der letzte Duft war eine Mischung aus HEN in 0,05%iger Konzentration und AMB in 0,125%iger Konzentration gelöst in PG. Die Mischung aus diesen beiden Düften wurde in der Studie Mix genannt. Somit wurden für diese Studie insgesamt vier Düfte verwendet.

IV.4 Ablauf der fMRT- Untersuchung- Tag 2

IV.4.1 Anamnese und Riechtest

Eine ausführliche Anamnese über Krankheitsbilder, die das Riechvermögen beeinflussen (z. B. Diabetes mellitus, Hirnerkrankung, Nierenerkrankung), frühere operative Eingriffe im Kopfbereich, Exposition gegenüber Chemikalien, Stäuben oder Gasen, Alkoholkonsum und Rauchgewohnheiten wurde erhoben. Es wurden nur Teilnehmer in die Studie aufgenommen, die keine der aufgeführten Erkrankungen aufwiesen (siehe Ein- und Ausschlusskriterien Tabelle 1). Anschließend folgte der Händigkeitstest- Fragebogen zur Feststellung der Links- oder Rechtshändigkeit. Alle Teilnehmenden waren Rechtshänder. Anschließend folgte vor dem Scan für alle Studienteilnehmer die Riechschwellentestung mit „Sniffin' Sticks“ (Hummel et al. 1997) für Phenylethylalkohol (PEA). Die genaue Riechschwelle für PEA wurde mit einer Treppenstufenmethode (staircase method) bestimmt. Den Probanden wurden die drei standardisierten Sniffin`Sticks nacheinander überreicht. Zwei dieser Riechstifte waren geruchlos und einer von diesen enthielt den Duftstoff. Die Studienteilnehmer hatten die Aufgabe, den duftenden Stift zu identifizieren.

Die Gerüche wurden in einer geometrischen Reihe (1:2) von 16 Verdünnungsreihen dargeboten, anfangen von 4 %iger PEA gelöst in PG. Die Testung begann mit der niedrigsten Konzentration. Die Konzentrationen wurden erhöht bis die Probanden zweimal konsekutiv den Duftstoff richtig erkannt hatten. Dann wurde die Treppenstufenmethode umgekehrt und abwärts bestimmt. Die Riechschwelle wurde als das Mittel von den letzten vier aus sieben Treppenstufenumkehrungspunkten definiert. Unter Nutzung eines Musterbeispiels von Laska et al., 1997 wurde die Unterscheidungsfähigkeit der Probanden zwischen den beiden Geruchsgemischen HEN und MIX geschätzt. Allen Probanden wurden drei Flaschen überreicht, wovon zwei eine Geruchsmischung enthalten haben (HEN oder MIX) und die dritte Flasche den anderen Duft enthielt. Sowohl bei der Riechschwellentestung mit den Riechstiften für PEA als auch bei der Durchführung des Diskriminationstests mit den Flaschen für die Geruchsgemische, mussten die Probanden bei maskierten Augen an den jeweilig dargebotenen Duftvorrichtungen riechen und sich für einen der drei Antwortmöglichkeiten entscheiden.

IV.4.2 Versuchsaufbau fMRT

Im Anschluss an die Anamnese und der Riechtestung folgte die fMRT- Untersuchung für ca. 45 Minuten. Für die Datenerfassung verwendeten wir einen 1,5 Tesla Magnetresonanzscanner (Sonata®, Siemens, Erlangen). Es wurde eine echoplanare Bildgebung (multi-slice spin-echo echo planar imaging sequence (SE-EPI)) verwendet (Strehling et al. 1991). Die Scan- Parameter lauteten: Echozeit (TE) von 35 ms und Repetitionszeit (TR) von 3000 ms und eine Mittlung der fMRT- Daten. Bei der fMRT- Untersuchung bekamen die Probanden konsekutiv vier Düfte in unterschiedlicher Reihenfolge dargeboten. Für jeden Duft gab es einen etwa fünf minütigen fMRT- Durchgang mit insgesamt 120 Scans. Zusätzlich erfolgte eine anatomische Bildgebung mit T1-Sequenzen. Die Probanden wurden in einem Block- Design getestet. Ein funktioneller Durchgang war in zwölf gleichlange Blöcke unterteilt. Jeder Block war 20 Sekunden lang. Während eines ca. vier minütigen Scans gaben wir sechs „on“- Blocks und sechs „off“- Blocks. Im ersten Block, während den ersten zehn Scans, bekamen die Probanden ausschließlich Frischluft zu riechen („OFF“), im zweiten Block den ersten Duft mit Luft gemischt („ON“), im dritten wieder nur Frischluft („OFF“), im vierten Block den nächsten Duft mit Luft gemischt („ON“) und das abwechselnd immer so weiter (siehe Abbildung 9).

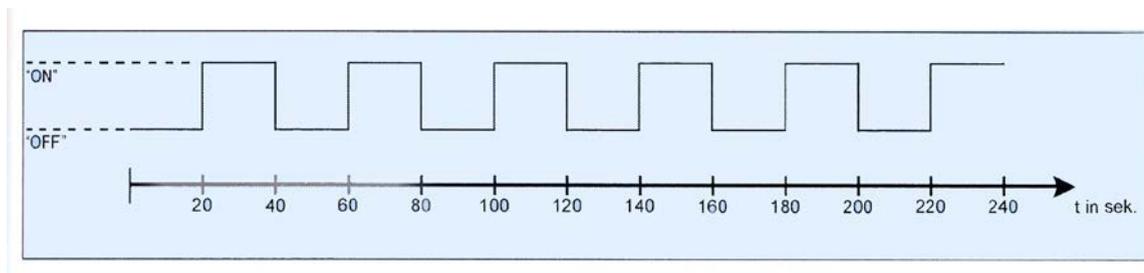


Abbildung 9

Geruchspräsentation aus Dreiwegehähnen im Block- Design

Die X- Achse stellt die Zeit (t) in Sekunden dar, die Y- Achse „ON“: Stimulus „OFF“: kein Stimulus (modifiziert nach <http://www.fmri-easy.de/fmri.htm>)

Das Duft- Luft- Gemisch im „on“- Block wurde immer eine Sekunde in die Nase geleitet, dann wurde der Duft durch den Taktgeber für zwei Sekunden unterbrochen und erneut für eine Sekunde das Duft- Luft- Gemisch und zwei Sekunden Frischluft ohne Duft geleitet. Die Versuchsanordnung bestand aus einem System von vier Flaschen mit je einem Volumen von 250 ml, Schlauchsystem mit Verbindungsstücken und Dreiwegehähnen. Über dieses System konnte eine Luftflussgeschwindigkeit von zwei l/ min in die Nase geführt werden. Über die Dreiwegehähne wurde geregelt, durch welche der vier Flaschen die Luft fließen und somit welchen der vier Düfte der Proband riechen sollte. In der ersten Flasche befand sich der Kontrollduft mit 100%igem PG , in der zweiten Flasche der HEN- Duft 0,05%ig gelöst in PG, in der dritten Flasche AMB 0,125% gelöst in PG und in der vierten Flasche eine Mischung aus dem HEN- Duft 0,05%ig und AMB 0,125%ig gelöst in PG.

IV.4.3 Versuchsdurchführung fMRT

Vor der fMRT- Untersuchung durften alle Studienteilnehmer zwei Stunden weder etwas essen noch rauchen, sie durften ausschließlich Wasser trinken. Die Probanden wurden im MRT auf dem Rücken gelagert und bekamen Kopfhörer aufgesetzt als Lärmschutz und zur Kommunikation während der Messung. Der Kopf wurde in einer Kopfspule fixiert und zusätzlich erhielten sie für Notfälle eine Klingel in die Hand. Nach dem ersten Durchlauf wurden die Probanden zum ersten präsentierten Duft befragt. Auf einer Skalen von null bis zehn sollten sie die Hedonik, Intensität, Bekanntheit und Belohnung angeben. Der erste Durchgang war somit vollzogen und dieses Verfahren wurde für die weiteren drei Düfte fortgesetzt. Alle Untersuchungen verliefen komplikationslos.

IV.5 Datenauswertung

IV.5.1. Psychophysik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) für Windows erstellt. Neben deskriptiver Statistik wurden bei den einzelnen Fragestellungen Vergleiche parametrischer Daten unter anderem mit dem t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde stets bei 0,05 angenommen. Eine Signifikanz lag vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) kleiner als das Signifikanzniveau war.

IV.5.2 fMRT

Für die statistische Auswertung und den Vergleich der Bilder untereinander mussten die Daten der Studienteilnehmer mit Hilfe eines sogenannten „Standardgehirns“ vereinheitlicht werden. Im Jahre 1988 erklärten Talairach und Tournoux das stereotaktische Koordinatensystem anhand des „Standardgehirn des Montreal Neurological Institute“ (MNI). Der Ursprungspunkt des Koordinatensystems liegt in der Commissura anterior. Die x- Achse zeigt nach rechts, die y- Achse nach vorn und die z- Achse nach oben. Die Maßeinheit der Koordinaten wird in Millimeter angegeben. Das MNI- System ermöglichte anhand der x-, y- und z- Koordinaten jeden Punkt im Gehirn zu bestimmen, die Bild- Daten der Probanden untereinander zu vergleichen und statistisch auszuwerten. Die Auswertung der Neuroimaging- Daten erfolgte mittels „Statistical Parametric Mapping“ SPM8 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK, in Matlab 7.1; MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Die entstandenen Artefakte durch physiologische Bewegungen wie Atmung oder Schluckbewegungen, durch natürliche kurze Kopfbewegungen während der Messung sowie durch Suszeptibilitätsunterschieden hervorgerufene regionale Bildartefakte oder Flussartefakte in der Region großer Gefäße und Systemrauschen aufgrund von thermischem Rauschen (Klose et al. 1999) wurden zur Datenauswertung korrigiert. Zur gleichen Positionierung der anatomischen Strukturen auf allen Scans wurden die Bilddaten um die x-, y-, und z- Achse gedreht und gekippt. Dadurch konnte jeder Scan dem ersten des Experiments angeglichen werden. Die Zuordnung der Aktivitätsänderungen bestimmter Hirnareale konnte durch die Überlagerung der anatomischen Aufnahmen erreicht werden. Anhand der räumlich normierten (stereotaktisch in MNI ICBM 152- space transformiert; MNI-template von SPM8 bereitgestellt) und geglätteten Bilder (8mm full width at half maximum (FWHM) Gaussian Kernel) konnten die Analysen durchgeführt werden. In der sogenannten „first level“ Analyse erfolgte die Glättung und Filterung der Artefakte durch ein SPM8 standard high- pass Filter mit einem cutt- off von 128 s. In der second level Analyse wurden die Unterschiede zwischen den Bildern mit verschiedenen Reizen in unterschiedlichen Gruppen analysiert. Durch diese Analyse konnten die signifikanten Unterschiede in der Aktivierung einzelner Hirnareale innerhalb der Gruppen beurteilt werden. Zur Filterung der studienrelevanten Hirnareale wurden die BOLD- Signale mit einem 8 Millimeter großen Suchfenster ermittelt. Die erregten Hirnareale führten zu einer Veränderung der BOLD- Signale. Diese Bereiche des Gehirns wurden für jeden der vier Düfte bei Reizung derselben Areale mit reiner Raumluft verglichen. Um signifikante Unterschiede der BOLD- Signale zwischen den beiden Gruppen und den unterschiedlichen Geruchsreizen prüfen zu können, wurden t- Tests und Korrelations- Analysen nach Pearson verwendet.

V Ergebnisse

V.1 Daten der psychophysischen Testung

V.1.1 Riechschwellermittlung von Ambroxan

Der Vergleich der ermittelten Riechschwellen für den Duftstoff AMB zeigte zwischen beiden Probandengruppen signifikant höhere Riechschwellenwerte für die INS Probandengruppe (10^2) als für die SEN Probandengruppe ($10^{4,6}$; $p < 0,001$). Für zehn Probanden wurde eine Schwelle von 10^2 bestimmt, sie waren folglich sehr insensitiv auf diesen Duftstoff (INS Gruppe). Im Diagramm als schwarzer Balken dargestellt. Die restlichen neun Probanden (SEN Gruppe) weisen einen Schwellenwert $> 10^4$ auf und sind sensitiver auf AMB (siehe Abbildung 10)

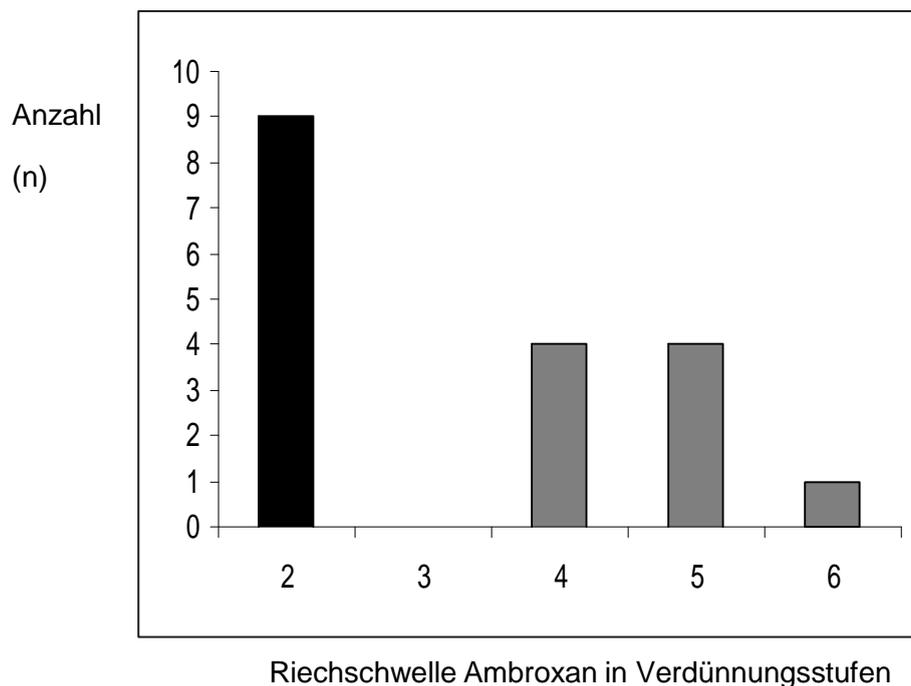


Abbildung 10

Ergebnisse der Riechschwellen für den Duftstoff AMB

Die X- Achse stellt die Verdünnungsstufen zwischen $1: 10^1$ und $1: 10^7$ für AMB gelöst in PG dar, die Y- Achse die Anzahl (n) der Probanden. Der schwarze Balken stellt die INS Gruppe dar, die grauen Balken stellt die SEN Gruppe dar

V.1.2 Riechschwellentestung von Phenylethylalkohol (PEA)

Vor dem Scannen der Probanden im MRT wurde für alle Studienteilnehmer die Riechschwelle für PEA mit den Sniffin` Sticks bestimmt. Im Gegensatz zum AMB Schwellentest fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Probandengruppen in der Riechschwelle für PEA. Die Riechschwellenwerte für die INS Gruppe lag bei 10,75, im Diagramm schwarz dargestellt und für die SEN Gruppe, grauer Balken, bei 11,75. Beide Probandengruppen waren in der Lage dazu PEA wahrzunehmen. (siehe Abbildung 11).

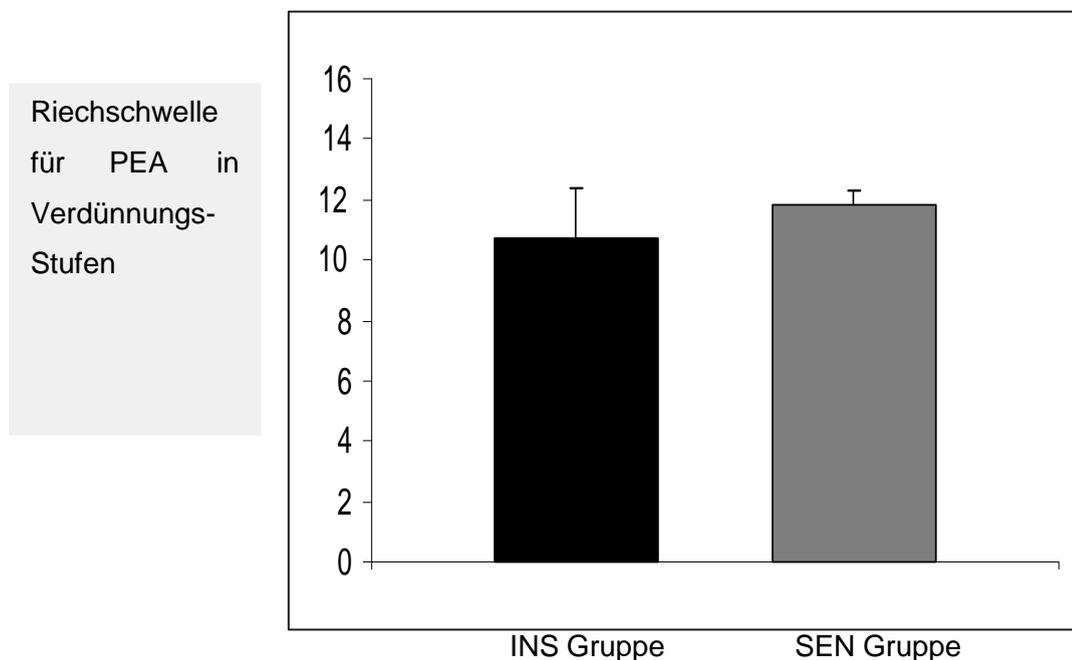


Abbildung 11

Ergebnisse der Riechschwellentestung für PEA

Die X- Achse stellt beide Probandengruppen dar, die Y- Achse die Riechschwelle (im Mittelwert mit Standardabweichung) für PEA. Der schwarze Balken stellt die Gruppe der INS Probanden dar, der graue Balken stellt die SEN Gruppe dar

V.1.3 Diskrimination von Duftstoffgemischen

Obwohl die Probandengruppen eine unterschiedliche Wahrnehmung von AMB aufwiesen, zeigte sich aber bei dem Vergleich der Diskrimination von beiden Geruchsgemischen HEN und MIX in beiden Gruppen ähnliche Werte für INS (4,1 von 9) und SEN (3,6 von 9). In beiden Probandengruppen war tatsächlich kein Proband in der Lage, die Geruchsgemische voneinander zu unterscheiden.

V.1.4 Beurteilung der Wahrnehmung im fMRT

In der Beurteilung der Wahrnehmung der dargebotenen Düfte während des Scans nach ihrer Intensität, Hedonik, Bekanntheit und Belohnung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Probandengruppen für die vier dargebotenen Düfte (siehe Abbildung 12).

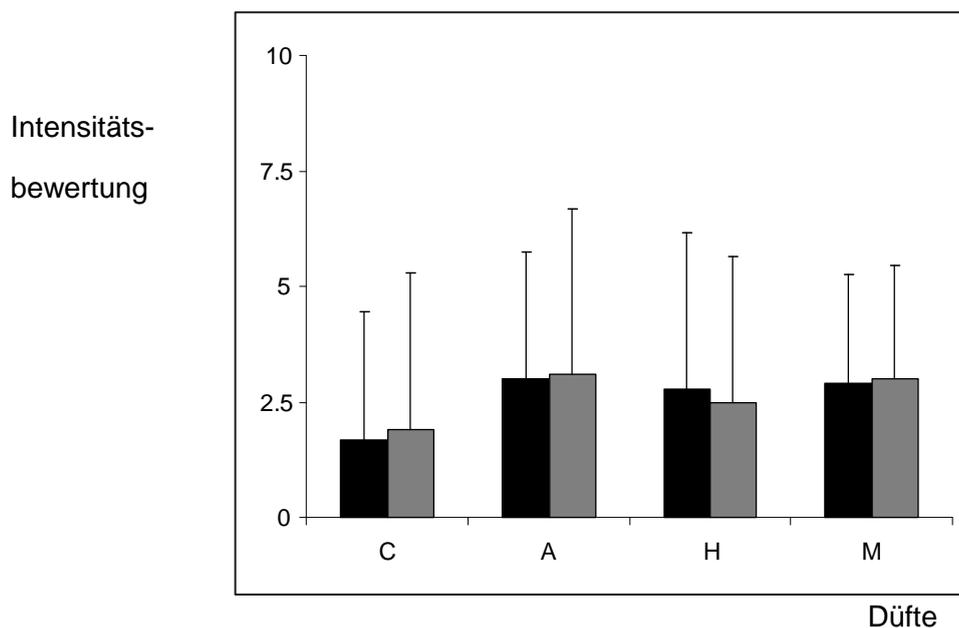


Abbildung 12

Ergebnisse der Intensitätsbewertung

Die X- Achse stellt die dargebotenen vier Düfte Kontroll- Duft PG (C), AMB (A), HEN- Duft (H) und Mix (M) dar, die Y- Achse steht für die Intensitätsbewertung durch die Probanden (im Mittelwert mit Standardabweichung) im MRT. Die schwarzen Balken stellen die Ergebnisse der INS Probanden auf AMB dar, die grauen Balken diejenigen der SEN Probandengruppe auf AMB

V.2 Daten des funktionellen MRT

Globale Kontraste

V.2.1 Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe

Zuerst wurden die drei Düfte AMB, Mix und HEN gruppiert und mit dem Kontrollduft PG verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass es ein cerebrales Ansprechen auf die Duftgruppe gibt. Während der Darbietung der Düfte AMB, HEN und Mix war bei allen Studienteilnehmern eine deutliche Zunahme der neuronalen Aktivität im Bereich der Insel und beidseitig der Amygdala (siehe Abbildung 13 und Tabelle 4).

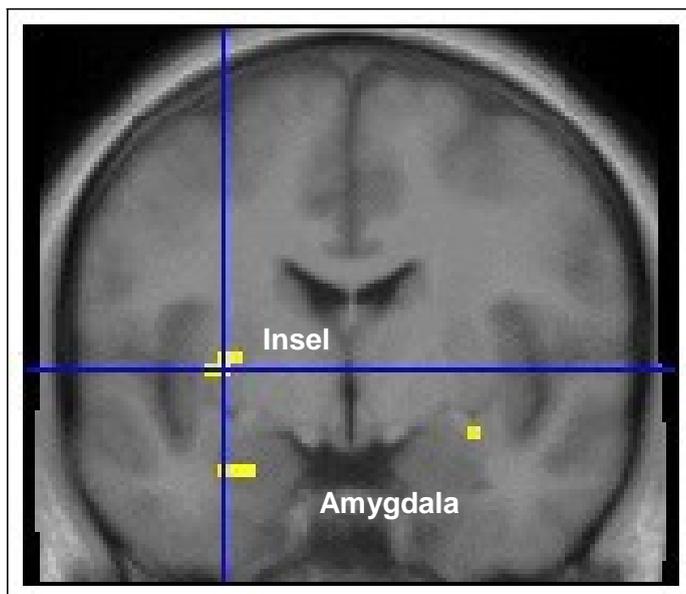


Abbildung 13

Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe

Die gelb leuchtenden Areale zeigen die Zunahme der neuronalen Aktivität nach Duftstimulation im Bereich der linken Insel und beidseitig der Amygdala

Tabelle 4**Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe**

Die Cluster werden durch den korrigierten p- (cor) Wert und ihre Koordinaten definiert.

Die X-, Y-, und Z- Achsen stellen die MNI- Koordinaten dar

L- links R- rechts G- Gyrus C- Cortex N- Nucleus L- Lobulus

	X	Y	Z	p- (cor) Wert	Hirnareal
1	-36	2	-35	<0.001	L inferiorer G temporalis
2	-27	8	10	<0.001	L Insel
3	39	-25	46	<0.01	R G postcentralis
4	-39	-13	16	<0.01	L Insel
5	-24	-4	-23	<0.05	L Amygdala + piriformer C
6	21	-25	37	<0.05	R G cingulus
7	-33	-7	13	<0.05	L Insel
8	30	-4	-14	<0.05	R Amygdala + piriformer C

V.2.2 Kontraste der Hirnaktivierungen zwischen Sensitiv und Insensitiv

Bei dem Vergleich der Gehirnaktivierungen der SEN und INS Probandengruppen nach Stimulation mit den Düften AMB, HEN und MIX zeigten sich deutliche Unterschiede (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5

Gehirnaktivierungen der SEN und INS Probandengruppen

Die Cluster werden durch den T- Wert und ihre Koordinaten definiert

X	Y	Z	T- Wert	Hirnareal
33	-7	10	4.9	R Insel
12	8	4	4.4	R N caudatus
-3	-1	37	4.2	L G cingulus
60	-52	43	4.0	R inferior parietal lobule
12	59	16	4.0	R G frontalis superior
-18	32	34	3.9	L G frontalis
0	-22	1	3.7	Hirnstamm
63	-10	7	3.7	R G temporalis superior

Die SEN Probandengruppe zeigte im Vergleich zu den INS Probanden stärkere chemosensorisch aktivierte Hirnareale im Bereich der rechten Insel, im rechten Nucleus caudatus und dem rechten superioren Gyrus temporalis (siehe Abbildung 14).

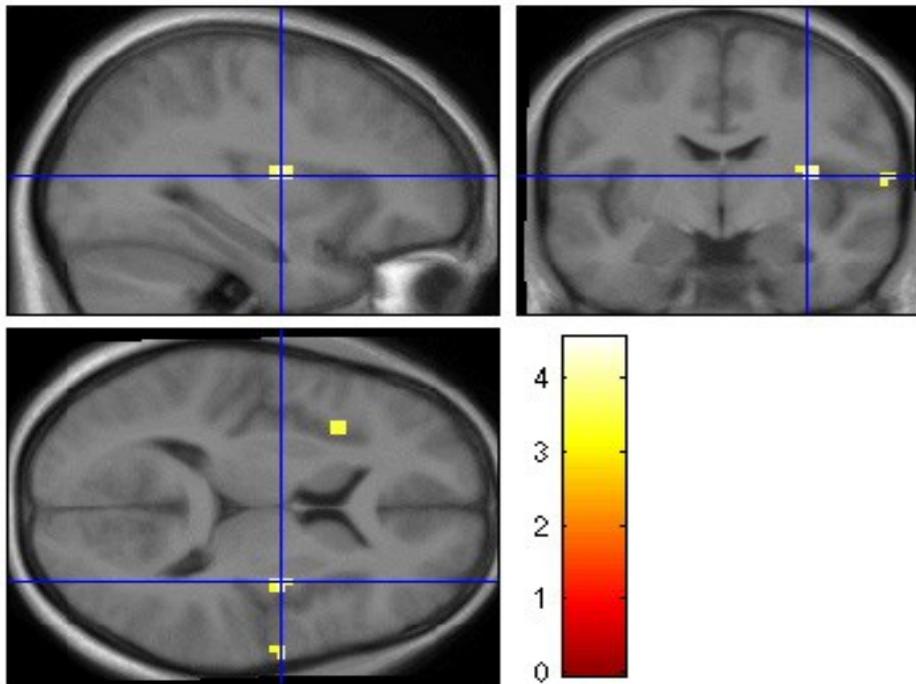


Abbildung 14

Kontraste zwischen SEN und INS Probanden

Die Skala stellt den T- Wert der Voxelcluster dar und definiert darüber die Farbe der Cluster. Nach Stimulation mit den drei Düften AMB, HEN und MIX in beiden Probandengruppen. Die Hervorgehobenen aktivierten Areale zeigen die rechte Insel, rechten Caudatus, rechten superioren Gyrus temporalis

V.2.3 Kontrast beider Probandengruppen bei alleiniger Präsentation von Ambroxan

Beim Vergleich der Scans beider Probandengruppen bei alleiniger Präsentation des Duftstoffes AMB zeigten sich bei den SEN Probanden stärker aktivierte Hirnareale im Bereich der rechten Insel als bei den INS Probanden (siehe Tabelle 6 und Abbildung 15).

Tabelle 6

Vergleich der sensitiven und insensitive Gruppen auf Ambroxan

Die Cluster werden durch den T- Wert und ihre Koordinaten definiert

X	Y	Z	T- Wert	Hirnareal
-24	26	7	4.1	L Insel
33	-7	10	4.1	R Insel
-3	-1	37	4.1	L G cingulus
-36	17	10	3.8	L Insel
-24	-10	-11	3.5	L G parahippocampalis

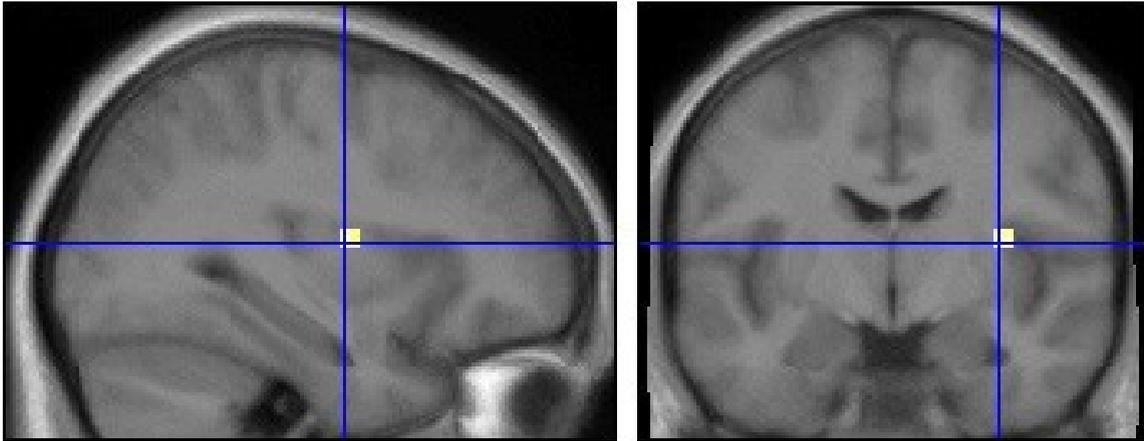


Abbildung 15

Hirnaktivierung beim Vergleich SEN und INS Probanden auf den Duftstoff AMB

Die aktivierten Areale zeigen die rechte Insel.

V.2.4 Vergleich zwischen ambroxanhaltigem Duft (Mix) und dem Duft ohne Ambroxan (Henkel) bei Sensitiven und Insensitiven

Die Datenanalyse in beiden Gruppen erfolgte getrennt. Die Ergebnisse von dem ursprünglichen Vergleich zwischen der Duftgruppe und Kontrollgruppe wurden maskiert, um falsch positive Aktivierungen der chemosensorischen Hirnareale auszuschließen. In dem Vergleich zwischen den beiden Düften Mix mit AMB und HEN ohne AMB zeigten sich in der SEN Probandengruppe Aktivierungen im rechten Striatum und Cingulus sowie beidseits im Gyrus präcentralis (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7**Vergleich der Düfte MIX und HEN bei der SEN Probandengruppe**

Die Cluster werden durch den T- Wert und ihre Koordinaten definiert

X	Y	Z	T- Wert	Hirnareal
30	-85	-8	3.7	R G occipitalis inferior
-39	-13	43	3.7	L G präcentralis
33	-61	10	3.7	R Striatum
18	-28	37	3.6	R G cingulus

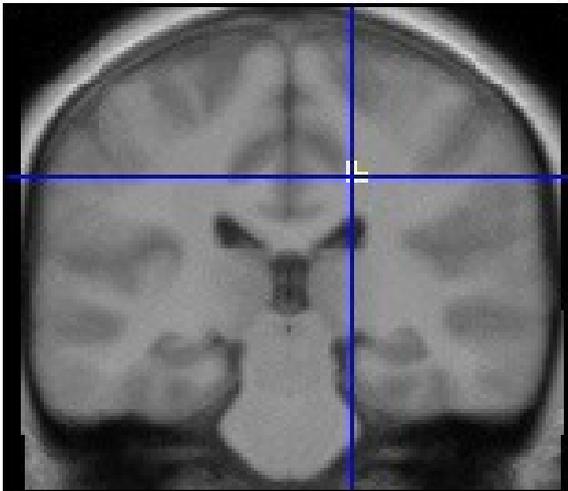
Der Vergleich zeigte in der Probandengruppe der INS eine ähnliche Aktivierung im rechten Cingulus. Kein anderes Hirnareal war aufzufinden, um signifikant aktiviert in diesem Vergleich zu sein (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8**Vergleich der Düfte Mix und HEN bei INS**

Die Cluster werden durch den T- Wert und ihre Koordinaten definiert

X	Y	Z	T- Wert	Hirnareal
21	-13	43	3.9	R G cingulus

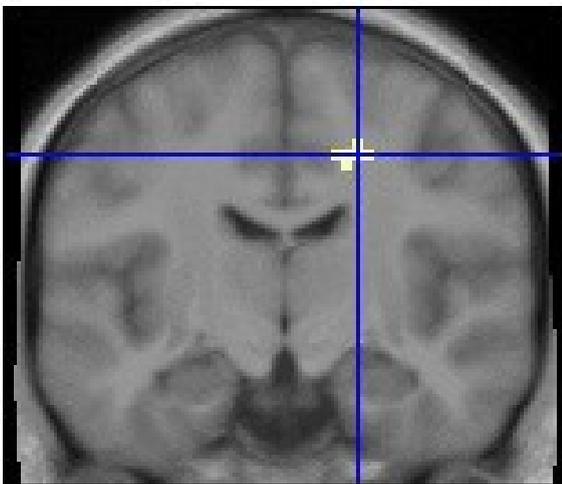
Der Vergleich zwischen beiden Probandengruppen verdeutlicht die ähnliche Aktivierung im Gyrus Cingulus und keines weiteren Hirnareals (siehe Abbildung 16 a und b).



dorsal

a) Gruppe SEN

Gehirnaktivierung mit AMB



ventral

b) Gruppe INS

Gehirnaktivierung ohne AMB

Abbildung 16 a und b

Aktivierung im rechten Cingulus in beiden Probandengruppen

VI Diskussion

In dieser fMRT- Studie wurde gezielt die cerebrale Wahrnehmung von Duftstoffgemischen mit unter-schwelliger Konzentration untersucht. Probanden, die bei dem Riechschwellentest mit AMB den Duftstoff olfaktorisch bewusst wahrgenommen hatten, zeigten nach Darbietung des Geruchs im fMRT- Bild stärkere chemosensorische Aktivierungen im Bereich der Insel. Diese Gruppe reagierte sensitiv auf diesen Duftstoff. Die INS Gruppe nahm AMB dagegen eher unter-schwellig wahr und zeigte im Vergleich zur SEN Gruppe eine geringere cerebrale Aktivierung. Jedoch konnten beide Gruppen bei der psychophysischen Diskriminationstestung mit Duftstoffgemischen, keinen der dargebotenen komplizierten Duftstoffmischungen, in An- oder Abwesenheit von AMB, voneinander unterscheiden. Aber ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei Darbietung der Duftstoffmischungen HEN und MIX war deutlich. Die AMB wahrnehmende Gruppe zeigte ein anderes und größeres cerebrales Aktivierungsmuster als die INS Probandengruppe.

Diese Studie führte zu drei wesentlichen Ergebnissen: **1)** Es wird dargestellt, dass die INS Gruppe, denen der Duftstoff AMB in einer unter-schweligen Konzentration dargeboten wurde, eine geringere Hirnaktivierung im Bereich der Insel aufzeigten. Dies verdeutlicht unbewusste olfaktorische Wahrnehmungsprozesse. Diese INS Probandengruppe konnte zwar bei der psychophysischen Schwellentestung den Geruch unter-schwellig wahrnehmen, jedoch wurden Hirnareale, auch wenn nur von geringer Intensität, aktiviert. Dies ist ein Hinweis auf die unbewusste Wahrnehmung. Hinweise auf eine unbewusste Wahrnehmung wurden bereits in Studien an Rezeptoren beschrieben, bei der die Geruchsstoffe zu olfaktorischen Potentialen führten, obwohl diese nicht von den Probanden wahrgenommen wurden. Diese Daten lieferten eine physiologische Basis für unter-schwellige Geruchsreize als Einfluss auf das menschliche Verhalten (Hummel et al., 2006). Eine fMRT Untersuchung von Sobel et al., 1999 zeigte ähnliche Effekte wie wir beobachten konnten. Er berichtete über cerebrale Aktivierungen von einem Geruchsstoff in unterschiedlich hohen und niedrigen Konzentrationen, der nicht bewusst wahrgenommen wurde. Ein Sinnesreiz kann, ohne bewusst wahrgenommen zu werden, das Verhalten beeinflussen. Eine Studie von Stern und McClintock, 1998 zeigte die Veränderung des Menstruationszyklus von Frauen bei unter-schwelliger Wahrnehmung eines olfaktorischen Reizes. Das Konditionieren mit unbemerkten Gerüchen kann eine negative Stimmung hervorrufen (Kirk-Smith et al., 1983). Für die SEN war der dargebotene Duft AMB in gleicher Konzentration überschwellig. Nach Präsentation des Geruchsstoffes zeigte daher die SEN Gruppe im Vergleich zur INS Gruppe größere Hirnaktivierungen in olfaktorischen Hirnarealen der linken und rechten Insel auf. Es ist bekannt, dass die Insel bei der olfaktorischen Verarbeitung vordergründig aktiv ist, wie

dies bei verschiedenen olfaktorischen Aufgaben von passiver Stimulation bis zu höheren olfaktorischen Funktionen gezeigt werden konnte. (Bengtsson et al., 2001; Dade et al., 2002; Djordjevic et al., 2005; Gottfried und Dolan, 2003; Hillert et al., 2007; Plailly et al., 2007; Savic et al., 2000; Sobel et al., 2000; Wang et al., 2005; Korbgeflecht et al., 2003).

2) Des Weiteren wurden mit dieser Studie frühere Ergebnisse anderer Studien bestätigt. Es konnte mit dieser psychophysischen Diskrimination gezeigt werden, dass die Probanden nicht in der Lage dazu waren, komplizierte Duftstoffmischungen voneinander zu unterscheiden. Eine Zusammensetzung eines Duftstoffgemisches mit einer bestimmten Komponente konnte nicht von einem identischen Gemisch ohne diese eine Duftstoffkomponente unterschieden werden, auch wenn die Probanden fähig waren, diesen einzelnen Duftstoff separat wahrzunehmen. Dieses Ergebnis entsprach anderen Studien, die gezeigt haben, dass wir verhältnismäßig schlecht die Komponenten von komplizierten Duftstoffgemischen analysieren können. In Untersuchungen von Livermore et al. wurde gezeigt, dass Menschen in der Lage dazu sind, die einzelnen Komponenten innerhalb eines komplizierten Duftstoffgemisches nur zu identifizieren, wenn das Gemisch weniger als fünf Geruchsstoffkomponenten enthält (Livermore und Laing, 1998). Die SEN Probandengruppe, die AMB bei alleiniger Darbietung wahrnehmen konnte und die INS Probandengruppe, die den Duftstoff AMB bei alleiniger Präsentation nicht wahrnehmen konnte, versuchten auf ähnliche Weise zwischen zwei Duftstoffgemischen zu unterscheiden, welches Gemisch AMB enthielt und welches Gemisch kein AMB enthielt.

3) Bei Betrachtung der Gehirnaktivierungen in MRT- Bildern waren jedoch deutliche Unterschiede nachzuweisen. Der Vergleich der Duftstoffgemische MIX und HEN zeigte in der SEN Probandengruppe Hirnaktivierungen im rechten unteren Gyrus occipitalis, im rechten Striatum und im Gyrus präcentralis im Vergleich zur INS- Gruppe. Interessanterweise ließen sich jedoch bei beiden Probandengruppen, bei dem Vergleich der Duftstoffgemische MIX und HEN, Aktivierungen im rechten Gyrus cingulus nachweisen. Hier soll noch einmal verdeutlicht werden, dass die INS Gruppe nicht in der Lage dazu war, den Duftstoff AMB in der verwendeten Konzentration wahrzunehmen und dass diese Gruppe, die beiden Geruchsgemische MIX und HEN nicht unterscheiden konnte. Trotzdem gibt es ein Gehirnareal, welches im Vergleich zur INS Gruppe signifikant mehr aktiviert wurde mit dem Duftstoffgemisch MIX. Der Gyrus cingulus verdient besondere Aufmerksamkeit im Kontext der Geruchsgemischverarbeitung. Es wurde beschrieben, dass der linke Gyrus cingulus eine stärkere Aktivierung bei der Darbietung binärer Gemische im Vergleich zur getrennten Präsentation der Einzelkomponenten des Gemisches zeigte (Boyle et al., 2009). Analog dazu könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die An- oder Abwesenheit von AMB zu

einer unterschiedlichen Aktivierung des Gyrus cingulus in beiden Probandengruppen INS und SEN führen könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Duftstoff, der innerhalb eines Geruchsgemisches präsentiert wird, zu einer unbewussten Gehirnaktivierung führen kann, auch wenn die Probanden die zwei Duftstoffgemische, mit oder ohne diesen bestimmten Duftstoff, in der psychophysischen Diskrimination nicht voneinander unterscheiden konnten. Dies scheint sogar für Probanden der Fall zu sein, die den Duftstoff in der dargebotenen Konzentration für die subjektive Wahrnehmung zu schwach finden, um den Duft bewusst wahrnehmen zu können. Das Gehirn nimmt den Duftstoff aber unterschwellig wahr und ist in der Lage dazu, Düfte zu verarbeiten, die der Mensch nicht bewusst wahrnimmt.

VII Literaturverzeichnis

Aron, A., Fisher, H., Mashek, D. J., Strong, G., Li, H., Brown, L.L.: Reward, motivation, and emotion systems associated with early-stage intense romantic love. *Journal of Neurophysiology*. 2005; 94(1): 327-37. Epub 2005 May 31.

Bengtsson, S., Berglund, H., Gulyas, B., Cohen, E., Savic, I., 2001. Brain activation during odor perception in males and females. *Neuroreport* 12, 2027-2033.

Boyle, J.A., Djordjevic, J., Olsson, M.J., Lundstrom, J.N., Jones-Gotman, M., 2009. The Human Brain Distinguishes between Single Odorants and Binary Mixtures. *Cereb Cortex* 19, 66-71.

Boyle, J.A., Lundstrom, 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.

Dade, L.A., Zatorre, R.J., Jones-Gotman, M., 2002. Olfactory learning: convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans. *Brain* 125, 86-101.

Djordjevic, J., Zatorre, R.J., Petrides, M., Boyle, J.A., Jones-Gotman, M., 2005. Functional neuroimaging of odor imagery. *Neuroimage* 24, 791-801.

Frasnelli, J., Lundstrom, J.N., Boyle, J.A., Katsarkas, A., Jones-Gotman, M., 2011. The vomeronasal organ is not involved in the perception of endogenous odors. *Hum Brain Mapp* 32, 450-460.

Gottfried, J.A., Dolan, R.J., 2003. The nose smells what the eye sees: crossmodal visual facilitation of human olfactory perception. *Neuron* 39, 375-386.

Gottfried, J.A., O'Doherty, J., Dolan, R.J., 2002. Appetitive and aversive olfactory learning in humans studied using event-related functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 22, 10829-10837.

Hillert, L., Musabasic, V., Berglund, H., Ciumas, C., Savic, I., 2007. Odor processing in multiple chemical sensitivity. *Hum Brain Mapp* 28, 172-182.

Hummel, T., Sekinger, B., Wolf, S.R., Pauli, E., Kobal, G., 1997. "Sniffin' sticks": olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem. Senses* 22, 39-52.

Jinks, A., Laing, D.G., 1999. A limit in the processing of components in odour mixtures. *Perception* 28, 395-404.

Kahle, W., Frotscher, M.: Taschenatlas der Anatomie Teil 3- Nervensystem und Sinnesorgane. 7. vollständig überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart. 2001; 224-229, 330-337.

Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L.B., Matsunami, H., 2007. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature* 449, 468-472.

Laska, M., Distel, H., Hudson, R., 1997. Trigeminal perception of odorant quality in congenitally anosmic subjects. *Chem Senses* 22, 447-456.

Leopold, D. A., Schwob, J. E., Youngentob, S. L., Hornung, D. E., Wright, H. N., Mozell, M. M.: Successful treatment of phantosmia with perseveration of olfaction. *Archives of otolaryngology- head & neck surgery*. 1991. 117(12): 1402- 1406.

Livermore, A., Laing, D.G., 1998a. The influence of chemical complexity on the perception of multicomponent odor mixtures. *Percept Psychophys* 60, 650-661.

Livermore, A., Laing, D.G., 1998b. The influence of odor type on the discrimination and identification of odorants in multicomponent odor mixtures. *Physiol Behav* 65, 311-320.

Lundstrom, J.N., Hummel, T., Olsson, M.J., 2003. Individual differences in sensitivity to the odor of 4,16-androstadien-3-one. *Chem Senses* 28, 643-650.

Mathe, A.: Die cerebrale Aktivierung von Müttern und Nulliparae bei der Wahrnehmung von Körpergerüchen fremder Neugeborener: eine fMRT- Studie

Novelline, R. A.: Squire`s Radiologie. Grundlagen der klinischen Diagnostik für Studium und Praxis. 2. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart.. 2001.

Ogawa, S., Lee, T.M., Kay A. R., Tank D. W.: Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(24): 9868-72.

Plailly, J., Radnovich, A.J., Sabri, M., Royet, J.P., Kareken, D.A., 2007. Involvement of the left anterior insula and frontopolar gyrus in odor discrimination. *Hum Brain Mapp* 28, 363-372.

Savic, I., Gulyas, B., Larsson, M., Roland, P., 2000. Olfactory functions are mediated by parallel and hierarchical processing. *Neuron* 26, 735-745.

Schmidt, R. F., Schaible, H.-G.: Neuro- und Sinnesphysiologie . 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin. 2001.

Silbernagel, S., Despopoulos, A.: Taschenatlas der Physiologie. 6. korrigierte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 2000.

Sobel, N., Prabhakaran, V., Desmond, J.E., Glover, G.H., Goode, R.L., Sullivan, E.V., Gabrieli, J.D., 1998. Sniffing and smelling: separate subsystems in the human olfactory cortex. *Nature* 392, 282-286.

Sobel, N., Prabhakaran, V., Zhao, Z., Desmond, J.E., Glover, G.H., Sullivan, E.V., Gabrieli, J.D., 2000. Time course of odorant-induced activation in the human primary olfactory cortex. *J. Neurophysiol.* 83, 537-551.

Temmel, A.F., Quint, C., Schickinger-Fischer, B., Klimek, L., Stoller, E., Hummel, T., 2002. Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 635-641.

Ulfig, N.: Kurzlehrbuch Neuroanatomie. Thieme Verlag, Stuttgart. 2008; 227-228, 253-254.

Wang, J., Eslinger, P.J., Smith, M.B., Yang, Q.X., 2005. Functional magnetic resonance imaging study of human olfaction and normal aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 510-514.

Wicker, B., Keysers, C., Plailly, J., Royet, J.P., Gallese, V., Rizzolatti, G., 2003. Both of us disgusted in My insula: the common neural basis of seeing and feeling disgust. *Neuron* 40, 655-664.

VIII Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels	6
<u>Abbildung 2:</u>	Vorgänge bei der G- Protein- aktivierten Signaltransduktionskaskade nach Bindung eines Duftstoffes an einen Rezeptor	7
<u>Abbildung 3:</u>	Olfaktorische Projektionsgebiete von den Mitralzellen des Bulbus Olfactorius zu den zentralen olfaktorischen Instanzen	8
<u>Abbildung 4:</u>	Zentrale olfaktorische Projektionen und Rindengebiete	10
<u>Abbildung 5:</u>	Der Magnetresonanztomograph	13
<u>Abbildung 6:</u>	Desoxyhämoglobin und Oxyhämoglobin	16
<u>Abbildung 7:</u>	Zeitlicher Verlauf des BOLD- Effektes	17
<u>Abbildung 8:</u>	„Sniffin `Sticks“	22
<u>Abbildung 9:</u>	Geruchspräsentation aus Dreiwegehähnen im Block- Design.....	26
<u>Abbildung 10:</u>	Ergebnisse der Riechschwellen für den Duftstoff Ambroxan.....	29
<u>Abbildung 11:</u>	Ergebnisse der Riechschwellentestung für Phenylethylalkohol.....	30

<u>Abbildung 12:</u> Ergebnisse der Intensitätsbewertung	31
<u>Abbildung 13:</u> Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe.....	32
<u>Abbildung 14:</u> Kontraste zwischen sensitiven und insensitiven Probanden	35
<u>Abbildung 15:</u> Hirnaktivierung bei sensitiven und insensitiven Probanden auf den Duftstoff Ambroxan.....	37
<u>Abbildung 16:</u> Aktivierung im rechten Cingulus in beiden Probandengruppen	39

XI Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	Klassifikation der Primärgerüche.....	11
<u>Tabelle 2:</u>	Gewebeparameter und Signalintensitäten in der MRT.....	15
<u>Tabelle 3:</u>	Einschluss- und Ausschlusskriterien	21
<u>Tabelle 4:</u>	Kontrast zwischen Duftgruppe und Kontrollgruppe	33
<u>Tabelle 5:</u>	Gehirnaktivierungen der sensitiven und insensitiven Probandengruppen.....	34
<u>Tabelle 6:</u>	Vergleich der sensitiven und insensitive Gruppen auf Ambroxan	36
<u>Tabelle 7:</u>	Vergleich der Düfte Mix und Henkel bei der sensitiven Probandengruppe	38
<u>Tabelle 8:</u>	Vergleich der Düfte Mix und Henkel bei Insensitiven.....	38

X Abkürzungsverzeichnis

AMB	Ambroxan
BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent
ca.	circa/ ungefähr
CBF	cerebraler Blutfluss
Cm	Centimeter
CT	Computertomographie
€	Euro
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
HEN	Henkelduft
INS	insensitive Probandengruppe
K	Kontrollgruppe
MIX	Duftstoffgemisch mit AMB+ HEN
MRT	Magnetresonanztomographie
rCBF	regionaler cerebraler Blutfluss
S.	Seite
sec.	Sekunde
SEN	sensitive Probandengruppe
SPM	Statistical Parametric Mapping
T	Zeit
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit

Die cerebrale Antwort auf Duftstoffgemische mit unterschwelligen Komponenten eine fMRT- Studie

Zusammenfassung der Dissertation in Deutsch

Die meisten Gerüche, denen wir im täglichen Leben begegnen, sind Mischungen von mehreren chemischen Substanzen. Während die cerebralen Antworten auf einzelne Duftstoffe verhältnismäßig gut im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte studiert wurden (z.B. (Gottfried et al., 2002; Savic et al., 2000; Sobel et al., 1998)), fehlen uns heute noch bedeutsame Informationen darüber, wie das Gehirn Duftstoffmischungen verarbeitet. In einer wegweisenden Veröffentlichung von Boyle et al. wurden die Gehirnaktivierungen bei Probanden nach einer PET (Positronen- Emissions- Tomographie) Untersuchung verglichen, die entweder mit reinen Duftstoffverbindungen oder binären Duftstoffgemischen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert wurden. Sie beobachteten, dass das Duftstoffgemisch den Gyrus Cingulus, den parietalen und den superioren frontalen Cortex zu einem größeren Umfang aktiviert hat, als die reinen Duftstoffverbindungen es taten. Des Weiteren berichteten sie darüber, dass durch die Stimulation mit binären Duftstoffgemischen in gleicher Konzentration der laterale orbitofrontale Cortex stärker aktiviert wurde und dass Duftstoffgemische mit einzelnen Komponenten in ungleicher Konzentration eine geringere Aktivierung bewirkten. Die geringste Gehirnaktivierung erfolgte durch die reinen Duftstoffverbindungen. Der anteriore orbitofrontale Cortex OFC wurde einerseits von den Duftstoffgemischen aktiviert und andererseits durch die reinen Duftstoffverbindungen deaktiviert (Boyle et al., 2009).

Obwohl also untersucht wurde, wie das Gehirn auf Gemische von Duftstoffen unterschiedlicher Konzentration und auf reine Duftstoffverbindungen reagiert, erklärt es nicht, wie wir Duftstoffmischungen wahrnehmen. Es wurde beschrieben, dass die Probanden nicht in der Lage dazu waren, auf Anhieb einen sehr vertrauten Geruch innerhalb eines Duftstoffgemisches aus 16 verschiedenen Gerüchen zu erkennen (Jinks und Laing, 1999). Die Autoren spekulierten, dass die Duftstoffe sich gegenseitig durch kompetitive Mechanismen an den olfaktorischen Rezeptorenzellen hemmen, womit der für die Geruchsidentifikation erforderliche räumliche Code verloren gegangen sein könnte (Jinks und Laing, 1999).

In dieser Studie wurde gezielt dieses Phänomen durch die Anwendung der funktionellen Magnetresonanztomographie untersucht, um die Gehirnaktivierungen von Probanden nach Stimulation mit Geruchsmischungen in unterschwelliger Konzentration aufzuzeichnen. Die Probanden für diese Studie wurden so ausgewählt, dass bestimmte Komponenten des

Duftstoffgemisches in beiden Probandengruppen nicht in derselben Art und Weise wahrgenommen wurden. Probanden, die bei dem Riechschwellentest mit Ambroxan den Duftstoff olfaktorisch bewusst wahrgenommen hatten, zeigten nach Darbietung des Geruchs im fMRT- Bild stärkere chemosensorische Aktivierungen im Bereich der Insel. Diese Gruppe reagierte sensitiv auf diesen Duftstoff. Die insensitive Gruppe nahm Ambroxan dagegen eher unerschwellig wahr und zeigte im Vergleich zur sensitiven Gruppe eine geringere cerebrale Aktivierung. Jedoch konnten beide Gruppen bei der psychophysischen Diskriminationstestung mit Duftstoffgemischen, keinen der dargebotenen komplizierten Duftstoffmischungen, in An- oder Abwesenheit von Ambroxan, voneinander unterscheiden. Aber ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei Darbietung der Duftstoffmischungen Henkel und Mix war deutlich. Die Ambroxan wahrnehmende Gruppe zeigte ein anderes und größeres cerebrales Aktivierungsmuster als die insensitive Probandengruppe. Diese Studie führte zu drei wesentlichen Ergebnissen: **1)** Es wird dargestellt, dass die INS Gruppe, denen der Duftstoff AMB in einer unerschwelligen Konzentration dargeboten wurde, eine geringere Hirnaktivierung im Bereich der Insel aufzeigten. Dies verdeutlicht unbewusste olfaktorische Wahrnehmungsprozesse. Diese INS Probandengruppe konnte zwar bei der psychophysischen Schwellentestung den Geruch unerschwellig wahrnehmen, jedoch wurden Hirnareale, auch wenn nur von geringer Intensität, aktiviert. Dies ist ein Hinweis auf die unbewusste Wahrnehmung.

2) Des Weiteren wurden mit dieser Studie frühere Ergebnisse anderer Studien bestätigt. Es konnte mit dieser psychophysischen Diskrimination gezeigt werden, dass die Probanden nicht in der Lage dazu waren, komplizierte Duftstoffmischungen voneinander zu unterscheiden. Eine Zusammensetzung eines Duftstoffgemisches mit einer bestimmten Komponente konnte nicht von einem identischen Gemisch ohne diese eine Duftstoffkomponente unterschieden werden, auch wenn die Probanden fähig waren, diesen einzelnen Duftstoff separat wahrzunehmen. Dieses Ergebnis entsprach anderen Studien, die gezeigt haben, dass wir verhältnismäßig schlecht die Komponenten von komplizierten Duftstoffgemischen analysieren können. **3)** Bei Betrachtung der Gehirnaktivierungen in MRT-Bildern waren jedoch deutliche Unterschiede nachzuweisen. Der Vergleich der Duftstoffgemische MIX und HEN zeigte in der SEN Probandengruppe Hirnaktivierungen im rechten unteren Gyrus occipitalis, im rechten Striatum und im Gyrus präcentralis im Vergleich zur INS- Gruppe. Interessanterweise ließen sich jedoch bei beiden Probandengruppen, bei dem Vergleich der Duftstoffgemische MIX und HEN, Aktivierungen im rechten Gyrus cingulus nachweisen. Hier soll noch einmal verdeutlicht werden, dass die INS Gruppe nicht in der Lage dazu war, den Duftstoff AMB in der verwendeten Konzentration wahrzunehmen und dass diese Gruppe, die beiden Geruchsgemische MIX und HEN nicht unterscheiden konnte. Trotzdem gibt es ein Gehirnareal, welches im Vergleich zur INS

Gruppe signifikant mehr aktiviert wurde mit dem Duftstoffgemisch MIX. Der Gyrus cingulus verdient besondere Aufmerksamkeit im Kontext der Geruchsgemischverarbeitung. Es wurde beschrieben, dass der linke Gyrus cingulus eine stärkere Aktivierung bei der Darbietung binärer Gemische im Vergleich zur getrennten Präsentation der Einzelkomponenten des Gemisches zeigte (Boyle et al., 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Duftstoff, der innerhalb eines Geruchsgemisches präsentiert wird, zu einer unbewussten Gehirnaktivierung führen kann, auch wenn die Probanden die zwei Duftstoffgemische, mit oder ohne diesen bestimmten Duftstoff, in der psychophysischen Diskrimination nicht voneinander unterscheiden konnten. Dies scheint sogar für Probanden der Fall zu sein, die den Duftstoff in der dargebotenen Konzentration für die subjektive Wahrnehmung zu schwach finden, um den Duft bewusst wahrnehmen zu können. Das Gehirn nimmt den Duftstoff aber unterschwellig wahr und ist in der Lage dazu, Düfte zu verarbeiten, die der Mensch nicht bewusst wahrnimmt. Trotz der Vielzahl der Studien auf diesem Gebiet sind viele Aspekte der unbewussten Wahrnehmung bisher noch nicht bekannt. So ist noch unklar in wieweit bei psychophysisch identischen olfaktorischen Fähigkeiten ein unterschiedliches cerebrales Aktivierungsmuster auftreten kann. Dies ist von besonderem Interesse bei Personen, die eine Insensitivität für spezifische Gerüche aufweisen. Die Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung dieser Frage dienen.

Brain responses to odor mixtures with subthreshold components

Abstract

Most odors we encounter in daily life are mixtures of several chemical substances. However, while brain responses to single odorous compounds have been relatively well studied over the last two decades (e.g., (Gottfried et al., 2002; Savic et al., 2000; Sobel et al., 1998)), we still lack significant information on how the brain processes mixtures of odorants.

In a paper by Boyle et al. authors compared brain activations in subjects which were stimulated with either pure odorants or binary mixtures in varying proportions using positron emission tomography (PET). They observed that the mixtures activated the cingulate, parietal and superior frontal cortex to a larger extent than the single compounds did. Further, they reported the lateral orbitofrontal cortex (OFC) to be activated strongest after stimulation with binary mixtures of equal concentrations, less by mixtures consisting of single compounds in unequal concentrations, and least by single compounds. The anterior OFC on the other hand was activated by mixtures and deactivated by single compounds (Boyle et al., 2009). However, although this study investigated how the brain reacts to mixtures consisting of odorants in different concentrations and single compounds, it does not yet fully explain how we perceive odor mixtures. In this study, we aimed to investigate the processing of odor mixtures containing an odor in a subthreshold concentration using behavioral measures and fMRI.

Subjects who were sensitive to the target odor ambroxan had stronger fMRI activations than insensitive subjects in chemosensory processing areas such as the insula. However, both groups of subjects were not able to distinguish a complex odor mixture containing or not containing ambroxan. Nevertheless, the sensitive subject group exhibited larger brain activations than the insensitive group when presented with the odor mixture containing ambroxan when compared to the odor mixture without ambroxan. This difference was smaller, though present for the insensitive group.

We show that an odor presented within a mixture of odors can influence brain activations although subjects are not able to distinguish the mixture with and without the odor. This appears to be true even for subjects to whom the odor presented on its own, is too weak to be perceived. For example, we know that subjects are not able to perform better than chance when asked to detect a highly familiar odor within a mixture consisting of 16 different odors (Jinks and Laing, 1999). The authors speculated that odorants inhibited each other through competitive mechanisms at the olfactory receptor cells; thus the spatial code needed for odor identification may be lost (Jinks and Laing, 1999).

We aimed to investigate this phenomenon closer by using functional magnetic resonance imaging to record brain activation of subjects smelling odor mixtures. We selected subjects carefully in order to assure that odor mixture components were not perceived in the same way in both groups. We took advantage of the huge variability in sensitivity in the population and investigated inter-individual differences in mixture processing by comparing brain responses to odorous stimuli in two groups of subjects. Both groups were stimulated with a.) a single odorant (ambroxan - AMB), b.) a complex mixture of several odorants (HEN), and c.) a mixture of AMB and HEN (MIX). Both groups of subjects had similar general olfactory function, as assessed with a standardized olfactory test. However, one group was specifically relatively insensitive (INS) to the odor ambroxan, whereas the other group was relatively sensitive (SEN) to the same odor. We exposed our subjects to the odors within an fMRI scanner; thereby we used AMB in a concentration which was above the detection threshold of the sensitive and below the detection threshold of the insensitive group. In this study we report three major findings.

First we show that subjects who are presented to an odor at subthreshold concentrations show lesser activation in the insula than subjects for those the odor at the same concentration is above the detection threshold. When SEN were presented with AMB, they exhibited larger activations than INS in several brain regions, involved in olfactory processing, all of which located in the left and right insula. The insula is prominently involved in olfactory processing; this brain structure is activated in subjects who perform different olfactory tasks from passive stimulation to higher order olfactory tasks (Bengtsson et al., 2001; Dade et al., 2002; Djordjevic et al., 2005; Gottfried and Dolan, 2003; Hillert et al., 2007; Plailly et al., 2007; Savic et al., 2000; Sobel et al., 2000; Wang et al., 2005; Wicker et al., 2003).

We further confirmed earlier findings in that way that subjects are not able to distinguish a complex mixture containing a certain odorous compound from an identical mixture without the very same compound, even if they are able to perceive the single compound on its own. This result is in line with several studies which showed that we perform relatively poorly when analyzing the components of complex mixtures. In a series of studies Livermore et al. showed that humans are able to detect and identify the single components within a complex mixture of odors only if the latter consists of less than five odorants (Livermore and Laing, 1998a, b). Consequently, both, subjects who could perceive AMB when presented as a single compound and subjects who could not perceive AMB when presented as a single compound, performed similarly when trying to distinguish between two mixtures, one containing the odor AMB and the odor not containing AMB.

With regards to brain activations, however, a different picture emerges. When MIX+A was contrasted with MIX, the SEN group showed activations of several brain regions including the

right inferior occipital gyrus, the right striate area and the left precentral gyrus; the INS group did not exhibit any activation in these areas. Interestingly, both, the INS and the SEN showed an activation in the right cingulate cortex when contrasting MIX+A with MIX. Here we would like to remind the reader that the INS group does not perceive AMB at the used concentration and they are not able to distinguish MIX+A from MIX; still, in the brain there is a region significantly more activated with MIX+A. The cingulate cortex deserves special attention in the context of mixture processing; the left cingulate has been shown to be activated stronger when subjects are presented with a binary mixture than with both single components separately (Boyle et al., 2009). One may hypothesize that, in analogy, the presence or absence of AMB in the concentration we used leads to a differential activation in the cingulate cortex of both subjects who perceive the compound and subjects who do not perceive the compound.

In summary, an odor presented within a mixture of odors can influence brain activations – even if subjects are not able to distinguish the mixture with and without the odor. This appears to be true even for subjects for which the odor, presented on its own, is too weak to be perceived.