

# **Altersabhängigkeit der gustatorisch evozierten Potentiale und die Topographie der Schmeckverarbeitung im Elektroenzephalogramm**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Severine Kunz

aus Burgstädt

Dresden 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>vi</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>3</b>
<b>3 Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
3.1 Der Schmecksinn.....	4
3.1.1 Periphere Anatomie.....	4
3.1.2 Schmeckqualitäten und Schmeckrezeptoren.....	5
3.1.2.1 Süß und Umami.....	6
3.1.2.2 Salzig und sauer.....	6
3.1.2.3 Bitter .....	7
3.1.3 Zentrale Verarbeitung .....	7
3.2 Einflussfaktoren auf den Schmecksinn.....	9
3.2.1 Alter.....	9
3.2.2 Geschlecht.....	9
3.2.3 Andere .....	10
3.3 Psychophysische Untersuchung des Schmecksinns .....	10
3.3.1 Schmecksprays.....	11
3.3.2 Schmeckstreifen .....	11
3.4 Elektrophysiologische Untersuchung.....	11
3.4.1 Evozierte Potentiale .....	12
3.4.2 Gustatorisch ereigniskorrelierte Potentiale.....	13
3.4.3 Technischer Hintergrund .....	13
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
4.1 Studiendesign.....	16
4.2 Probanden.....	16
4.3 Verwendete Schmeckstoffe.....	16
4.4 Das Gustometer .....	17
4.5 EEG Ableitung .....	19
4.6 Vorbereitung der Probanden.....	20
4.6.1 Testung des Schmeckvermögens.....	20
4.6.2 Testung des Riechvermögens.....	20
4.6.3 Wortschatztest.....	20
4.6.4 Vorbereitung der Probanden.....	21
4.7 Versuchsablauf.....	22

4.7.1 Aufzeichnung der evozierten Potentiale.....	22
4.8 Analyse der EEGs.....	22
4.8.1 Abschnittsbildung, Reduktion von Artefakten und Mittelung der EEG-Daten .....	22
4.8.2 Microstate segmentation .....	23
4.8.3 Microstate fitting .....	24
4.8.4 Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität (source localisation) .....	25
4.9 statistische Auswertung .....	28
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
5.1 Probandenkollektiv .....	29
5.2 Altersabhängigkeit des Riech- und Schmeckvermögens in den Vortests mittels sniffin' sticks und Schmeckstreifen.....	31
5.3 Analyse der EEG-Daten.....	34
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>41</b>
6.1 Einfluss des Alters auf das Riech- und Schmeckvermögen.....	41
6.2 Topographie der Schmeckverarbeitung im Gehirn.....	43
6.2.1 Cerebellum mit Schlüsselfunktion?.....	46
6.2.2 Apoplektischer Insult und Schmeckstörung.....	47
6.2.3 Unterschiede im Alter .....	49
6.3 Konsequenzen der vorliegenden Studie .....	51
6.3.1 Methodenkritik .....	51
6.3.2 Stellenwert der Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens im Alltag, der Klinik und Industrie.....	53
6.3.3 Ausblick .....	54
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
7.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache.....	56
7.2 Zusammenfassung in englischer Sprache - summary .....	59
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
9.1 Aufklärungs- und Fragebögen .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
9.2. Auswertungsbögen Riech- und Schmecktests.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Zentrale Verarbeitung des Schmeckens (Dutta et al. 2013).....	9
Abbildung 2 Elektrodenposition 128-Kanal-EEG.....	15
Abbildung 3 Das Gustometer.....	18
Abbildung 4 Anlage (Gustometer) mit computergesteuerten Spritzenpumpen. ....	18
Abbildung 5 Position der Probanden während der Messung .....	21
Abbildung 6 microstate segmentation .....	24
Abbildung 7 3D-Gitter mit 5000 Auflösungspunkten .....	25
Abbildung 8 MNI Kopf-Vorlage: Standard Modell des Gehirns .....	26
Abbildung 9 Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität mit Cartool .....	27
Abbildung 10 Verteilung des Alters innerhalb der Altersklassen. ....	30
Abbildung 11 Altersabhängigkeit des Riechvermögens (sniffin' sticks) .....	31
Abbildung 12 Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens (Schmeckstreifen).....	32
Abbildung 13 Abnahme der Mittelwerte (Testergebnis Schmeckstreifen-Test).....	33
Abbildung 14 Abnahme der Mittelwerte (Testergebnis sniffin' sticks).....	33
Abbildung 15 Butterfly plots .....	34
Abbildung 16 microstate segmentation für die vier Altersgruppen .....	35
Abbildung 17 map 1: Axialschnitt des menschlichen Gehirns.....	37
Abbildung 18 map 2: Axialschnitt des menschlichen Gehirns.....	37
Abbildung 19 map 4: Axialschnitt des menschlichen Gehirns.....	38
Abbildung 20 map 5: Koronarschnitt des menschlichen Gehirns .....	38
Abbildung 21 microstate segmentation für die vier Altersgruppen .....	39
Abbildung 22 Graphische Darstellung der Verteilung von map 4 und map 5 .....	40
Abbildung 23 Resultate zehn verschiedener Neuroimaging-Studien.....	45
Abbildung 24 CT ohne Kontrastmittel.....	48

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Verwendete Schmeckstoffe.....	17
Tabelle 2 Altersverteilung der Probanden .....	29
Tabelle 3 Anzahl und Altersverteilung der Probanden .....	29
Tabelle 4 Altersabhängigkeit des Riechvermögens (sniffin' sticks; korrekt erkannte Düfte) ..	31
Tabelle 5 Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens (Schmeckstreifen; korrekt Erkannte)	32

# **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CSD	current source density
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiographie
EKP	ereigniskorreliertes Potential
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
EOG	Elektrookulogramm
ERP	event-related potential (ereigniskorreliertes Potential)
etc.	et cetera
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GEKP	gustatorisch ereigniskorreliertes Potential
gERP	gustatory event-related potential (gustatorisch ereigniskorreliertes Potential)
GFP	global field power
ISI	Interstimulusintervall
MEG	Magnetenzephalographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid

PET	Positronenemissionstomographie
s.	siehe
SEP	somatosensibel evozierte Potentiale
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnlichen/-m
VEP	visuell evozierte Potentiale
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Unsere Sinnesorgane sind verantwortlich für die Wahrnehmung der uns umgebenden Reize. Sie reagieren auf akustische, optische und taktile Reize oder wie beim Riechen und Schmecken auf chemische Substanzen. Die Sinne ermöglichen dem Menschen eine Orientierung in seiner Umwelt, warnen vor Gefahren und vermitteln Genuss. Dabei beschreibt Gesundheit einen Zustand, in dem der Mensch vergisst, dass er gesund ist. Auch das Schmecken gehört zu den unterschätzten Funktionen des menschlichen Körpers, welches uns täglich dutzendfach Freude beschert, genießen lässt oder auch Abneigungen gegen verschiedene Nahrungsmittel hervorbringt. Oft ist es erst eine Störung oder der Ausfall dieses komplexen Sinnessystems, der die Aufmerksamkeit des Menschen auf das Schmecken richten lässt. Eine Evaluation von Schmeckstörungen gestaltet sich insofern schwierig, als dass es immer wieder große Diskrepanzen zwischen Beschreibungen der Patienten und quantifizierter Schmeckfunktion gibt.

Um Geschmack und dessen Wahrnehmungsvermögen vergleichbar zu machen, bedient man sich psychophysischer Testmethoden, wie etwa Schmecksprays oder Schmeckstreifen, die die Mitarbeit der Probanden bzw. Patienten voraussetzen. Diese Subjektivität macht derlei Methoden störanfällig, aber auch manipulierbar. Vor allem in gutachterlichen Fragestellungen und bei Verdacht auf Aggravation empfiehlt sich daher die Kontrolle der Messergebnisse mit objektivierbaren Verfahren. Im Gegensatz zum olfaktorischen System, dessen Diagnostik und Therapie bereits seit zwei Jahrzehnten klinisch etabliert ist, steckt die Forschung der Schmeckverarbeitung noch in den Kinderschuhen. Unter Zuhilfenahme der Elektroenzephalographie, der Ableitung von Hirnströmen über die Kopfhaut, können, unabhängig von der Mitarbeit des Probanden, Daten über die Informationsverarbeitung von Sinnesreizen gewonnen werden. Das erste gustatorisch evozierte Potential wurde bereits vor etwa einem halben Jahrhundert aufgezeichnet (Ohla et al. 2012). Umso erstaunlicher ist es, dass trotz der Zeitspanne, im Vergleich zu anderen Sinnessystemen, bisher recht wenig über die neuronale Verarbeitung gustatorischer Reize im Gehirn bekannt ist. In der Literatur finden sich nur wenige Daten, Untersuchungen und Artikel zum Schmeckvermögen im Allgemeinen sowie zu den objektiven Messverfahren und deren Reliabilität im Speziellen. Die periphere Anatomie des Schmeckorgans scheint erschlossen, auch über den Verlauf der Verarbeitung des Schmeckreizes bis hin zum Thalamus herrscht Einigkeit. Über die weiterführenden Bahnen in den primären und sekundären gustatorischen Kortex gibt es in der aktuellen Literatur keine einstimmige Meinung, jedoch zahlreiche Vermutungen. Auch wird noch immer darüber spekuliert, woher die Abnahme des Schmeckvermögens im Alter



rührt und ob nicht neuronale Prozesse Ursache dieses mehrfach beschriebenen Phänomens (Murphy and Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014) sind, oder ein physiologischer Verlust des Schmeckempfindens dafür verantwortlich gemacht werden kann (Cowart et al. 1994), der unter anderem mit der Abnahme der Dichte von Schmeckrezeptoren und –papillen erklärt werden kann. Auf Interesse stößt diese Frage nicht allein in den Laboratorien der Riech- und Schmeckforschung. Auch die Lebensmittelindustrie und Kliniker tragen ihren Teil dazu bei, den Erkenntnisgewinn im Sinne des Patienten zu nutzen. So kann Malnutrition infolge der Reduktion des Schmeckvermögens durch gezielt aufbereitete Nahrungsmittel verhindert und somit der Gesundheitszustand der älteren Bevölkerung verbessert werden oder aber eine Sensibilisierung des Personals in Kliniken für das Phänomen der Abnahme der Sinnesempfindungen erfolgen, um eine Diagnostik und Therapie frühzeitig einzuleiten und evtl. Spätfolgen zu verhindern. Nicht zuletzt der demographische Wandel unserer Bevölkerung ist es, der ein Augenmerk auf gesundes Altern legen sollte. Jedem Einzelnen könnten die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit und die daraus gewonnenen Konsequenzen für seine Gesundheit und die seiner Mitmenschen folglich Wert haben.

## **2 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit**

Der Geschmack ist ein leistungsstarkes System, über das es noch viele Fragen zu beantworten gilt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Fragestellungen. Zum einen ist es das Ziel aktueller Schmeckforschung, ein Messverfahren zu etablieren, welches bei der Zusammenarbeit mit unzureichend kooperativen Patienten in psychophysischen Verfahren dennoch aussagekräftige, objektive Befunde über die Funktionalität des Schmecksinnes liefert. Solche unkooperativen Patienten können z.B. Kinder oder demenzkranke Patienten sein, deren kognitive und sprachliche Fähigkeiten zu einer differenzierten Diagnostik von Schmeckstörungen nicht ausreichen. Aber auch zur gutachterlichen Beurteilung in Rechtsfragen kann eine Objektivierung der Schmeckfähigkeit von Nöten sein. Um ein solches Messverfahren in der Schmeckforschung brauchbar zu machen, müssen noch einige Grundlagen geschaffen werden. Diese zur Erlangung der Ergebnisse umzusetzen und damit auch ein objektives Messverfahren der Schmeckfähigkeit für den klinischen Alltag zu etablieren, soll ein Teilziel dieser Arbeit sein.

Des Weiteren verfolgt die vorliegende Dissertationsschrift das Ziel, die bisher erlangten Kenntnisse bezüglich der Erregungsmuster des Gehirns nach Schmeckstimulation zu konkretisieren und deren differierende Empfänglichkeit für die fünf Schmeckrichtungen zu verdeutlichen. Außerdem sollen Unterschiede in definierten Altersklassen bei der Schmeckverarbeitung im Gehirn aufgezeigt werden. Verschiedene Arbeiten (Murphy and Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014) bestätigen die Abnahme des Schmeckens mit dem Alter. Sie geben Grund zu der Annahme, dass sich auch die Verarbeitung des Schmeckens, sei es peripher oder zentral, im jungen Alter von der des älteren Menschen unterscheidet. Eine genaue Lokalisation der Schmeckverarbeitung im Gehirn soll Aufschluss darüber geben, ob es auf neuronaler Ebene Unterschiede zwischen jungen und älteren Menschen gibt.

### **3 Grundlagen**

#### **3.1 Der Schmecksinn**

Die Informationen, die uns durch das gustatorische System vermittelt werden, dienen zum einen dazu, essbare und gehaltvolle Nahrungsquellen zu identifizieren, andererseits giftige und ungenießbare Substanzen zu meiden (Yarmolinsky et al. 2009). Sie ermöglichen uns vor, während und auch nach der Schmeckwahrnehmung außerdem die hedonische Bewertung der potentiellen Nahrung. Damit fungiert der Schmeckeindruck im weitesten Sinne als Vitalfunktion, die ein enges Zusammenspiel von Wahrnehmung und Verhalten bedingt, etwa dem sofortigen Ausspucken giftiger Substanzen oder aber dem Genuss von lebenswichtigen Energielieferanten (Ohla et al. 2012). Der Schmecksinn wird nicht allein durch die Papillen der Zunge vermittelt (Djordjevic et al. 2004). Einen erheblichen Einfluss auf das Empfinden haben zusätzlich taktile Reize (Nederkoorn et al. 2014), Temperatur, die Textur des Stoffes und das Geräusch beim Verzehr der Nahrung. Auch das ortho- sowie retronasale Riechen interagieren mit der Wahrnehmung der unterschiedlichen Aromen (Bojanowski und Hummel 2012). Emotionale Einflüsse, wie etwa die derzeitige Stimmungslage oder Erinnerungen an bestimmte Geschmäcker, sogar die reine Vorstellung eines Geruches während des Essens, beeinflussen die Schmeckwahrnehmung und die Bewertung eines Nahrungsmittel als „gut“ oder „schlecht“ signifikant (Djordjevic et al. 2004).

##### **3.1.1 Periphere Anatomie**

Das Schmeckorgan des Menschen befindet sich am Eingang des Verdauungstraktes in der Mundhöhle. Die Schmeckrezeptoren sind allerdings nicht nur an den Zungenrändern und -rücken, sondern auch auf dem weichen Gaumen, der Nasenschleimhaut sowie im Bereich des Kehlkopfes und Rachens lokalisiert. Auch in der Magenschleimhaut (Höfer et al. 1996) und auf der glatten Muskulatur der Bronchien (Deshpande et al. 2010) werden sie exprimiert. Die Schmecksinneszellen sind zu vielen in einer Schmeckknospe organisiert. Mehrere dieser Schmeckknospen befinden sich in der seitlichen Wand einer Zungenpapille, insbesondere sind dies im vorderen Bereich der Zunge die Papillae fungiformes mit durchschnittlich fünf Schmeckknospen, an den hinteren Seitenrändern die Papillae foliatae und im Bereich des Zungengrundes ein Kreis aus ca. neun Papillae vallatae mit oft dutzenden von Schmeckknospen (Smith and Margolskee 2001). Die ebenfalls auf der Zunge befindlichen Papillae filiformes dienen wahrscheinlich dem Anrauen der Zunge und somit der Nahrungszerkleinerung. Sie enthalten keine Schmeckknospen. Die räumliche Nähe der Knospen zu den von Ebner Drüsen, welche Proteine und Speichel sezernieren, dient unter anderem der Reinigung der Sinneszellen, um diese für neue Stimuli empfänglich zu machen.

Eine Schmeckknospe besteht aus etwa 20 spindelförmigen Zellen, die zwiebelschalenartig zusammengelagert sind und lumenwärts den sogenannten Schmeckporus bilden. In diesen ragen zahlreiche Mikrovilli der Sinneszellen hinein, welche in der Lage sind, Moleküle zu binden, um so die Schmeckqualitäten süß, sauer, salzig, bitter und umami wahrzunehmen. Die Schmeckzellen sind Sinneszellen, ihnen fehlt ein Axon. Innerhalb der Schmeckknospen werden die Informationen auf afferente Nervenfasern der Hirnnerven VII, IX und X übertragen, deren Kerne im Hirnstamm liegen. Die Nuclei tractus solitarii, als einziger Kernkomplex der Schmeckempfindung im Hirnstamm, empfangen alle Schmeckfasern. Über den Thalamus werden die viszerosensiblen Impulse in die Inselrinde sowie die Rinden des angrenzenden Operculum frontale projiziert (Kobayakawa et al. 1996; Smith et al. 1998; Frey and Petrides 1999; Schoenfeld et al. 2004).

Die Schmeckinformation wird in sekundäre kortikale Rindenfelder des orbitofrontalen Kortex weitergeleitet, die sich mit den sekundären olfaktorischen Rindengebieten überlappen.

Die Schmeckwahrnehmung der vorderen zwei Drittel der Zunge wird den Nuclei tractus solitarii über die Chorda tympani des Nervus facialis zugeleitet. Der Nervus glossopharyngeus innerviert das hintere Drittel der Zunge über den Nervus lingualis in das Ganglion petrosum. Der weiche Gaumen wird vom Nervus petrosus major superficialis, einem weiteren Ast des Nervus facialis, somatosensorisch innerviert. Die Schmeckrezeptoren am Zungengrund, in der Rachenwand und an der Epiglottis werden vom Nervus laryngeus superior des Nervus vagus versorgt, dessen Neurone ebenfalls im Ganglion petrosum liegen (Trepel 2012).

#### **3.1.2 Schmeckqualitäten und Schmeckrezeptoren**

Die Schmeckwahrnehmung spielt für die Nahrungsaufnahme eine wesentliche Rolle. Sie hilft uns dabei zu entscheiden, welche Nahrung dem Körper Energie und lebensnotwendige Bausteine liefert und welche besser gemieden werden sollte. Der Mensch entwickelte im Laufe der Evolution Geschmacksvorlieben für die drei Makronährstoffe Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette. Derzeit gelten die fünf Grundschmeckqualitäten süß, sauer, salzig, bitter sowie umami als wissenschaftlich anerkannt.

Umami, was im Jahre 1908 durch Ikeda erstmals isoliert dargestellt werden konnte, bezeichnet die Schmeckqualität, die hauptsächlich über den Eiweißbaustein Glutamat vermittelt wird (Nakamura 2011). Dessen Name entstammt dem Japanischen und bezieht sich auf den Wohlgeschmack der von ihm detektierten Schmeckstoffe. Interessanterweise besteht für diesen Geschmack bei 3-4% aller gesunden Menschen eine „Blindheit“ (Singh et al. 2011). Umami und süß werden als „gute“ Geschmäcker bezeichnet, die den Verzehr

nutritiver Nahrungsmittel (wie Bausteine für die Proteinsynthese und Energielieferanten) fördern. Bitter und sauer dagegen werden einem „schlechten“ Geschmack zugeordnet. Sie machen den Körper wachsam gegenüber potentiell toxischen Substanzen und niedrigen pH-Werten (z.B. giftige Pflanzen oder verdorbene und unreife Früchte). Salz können wir sowohl als „gut“, als auch als „schlecht“ empfinden, abhängig von der Konzentration und dem aktuellen Bedürfnis an Elektrolyten (Lindemann 2001; Bachmanov et al. 2002). Aktuelle Forschungen weisen zudem auf die Existenz eines Fettrezeptors hin, der für die Fettgeschmackswahrnehmung verantwortlich sein könnte. Am ehesten geht man derzeit von einem Zusammenhang mit dem Rezeptor GPR120 aus (Galindo et al. 2012).

Im Folgenden wird auf die genaue Vermittlung der genannten Grundsckmeckqualitäten eingegangen.

#### **3.1.2.1 Süß und Umami**

Für den Menschen konnten bisher drei G-Protein gekoppelte Rezeptoren detektiert werden, die für die Schmeckwahrnehmung von süß und umami verantwortlich gemacht werden (Liao und Schultz 2003): T1R2 und T1R3 für den süßen Geschmack, T1R1 und T1R3 für das Schmecken von umami. Einige Schmeckzellen exprimieren T1R3 allein, während andere T1R1 oder T1R2 jeweils zusammen mit T1R3-Rezeptoren ausbilden. Die T1R2/T1R3 Heterodimere können neben Zuckern z.B. auch von D-Aminosäuren, Glycinen und Proteinen wie Monellin und Thaumatin aktiviert werden (Yarmolinsky et al. 2009). Der Umamigeschmack wird durch ein Rezeptordimer zweier G-Protein gekoppelter Rezeptoren, T1R1 und T1R3, vermittelt. T1R1/T1R3 weist artenabhängige Unterschiede in der Ligandenspezifität auf. Menschliches T1R1/T1R3 kann von vielen L-Aminosäuren aktiviert werden (Li 2009; Toda et al. 2013).

#### **3.1.2.2 Salzig und sauer**

Kochsalz, oder genauer Natriumchlorid, ist unverzichtbarer Bestandteil unserer Nahrung. Denn die Zufuhr dieses Mineralstoffes ist mitverantwortlich dafür, dass unser Elektrolythaushalt nicht aus dem Gleichgewicht gerät. Versalzene Kost gilt es allerdings zu meiden. Die Detektion gelingt dem Menschen wahrscheinlich über den so genannten epithelialen Natriumkanal (ENaC). Diese Ionenkanäle sind selektiv für Natrium, Kalium und Wasserstoff. Natriumionen gelangen über die ENaC-Kanäle in die Sinneszellen und führen dort zu einer Depolarisation (Boughter und Bachmanov 2007).

Die Schmeckrichtung „sauer“ ist ein Indikator für eine Erniedrigung des pH-Wertes. In der Natur hütet sie uns vor verdorbenen Nahrungsmitteln oder hilft beispielsweise unreife

Früchte zu meiden. Es wird angenommen, dass auch der Geschmack sauer durch Ionenkanäle übertragen wird. Über den genauen Aufbau und die Funktion der Rezeptoren besteht endgültig noch keine Einigkeit. Der PKD2L1 Rezeptor scheint als Kandidat für die Wahrnehmung des sauren Geschmacks als wahrscheinlich. Daneben fanden die Forscher PKD2L1 auch in spezifischen Neuronen in der Umgebung des Zentralkanal des Rückenmarks, wo sie auf Änderungen des pH-Wertes reagierten. PKD2L1 gehört zu einer Familie von Proteinen, die als „polycystic-kidney-disease-like“ Ionenkanäle bezeichnet werden. Mutationen in anderen Vertretern dieser Proteinfamilie können ein Nierenversagen auslösen (Huang et al. 2006).

#### **3.1.2.3 Bitter**

Bitter ist die wohl differenzierteste aller Schmeckrichtungen. Die fein abgestimmte Bitterwahrnehmung beruht auf einer Gruppe von 25 Bitterrezeptoren (TAS2R), welche zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Die Schmeckknospenzellen exprimieren TAS2Rs, denen es möglich ist, eine Unmenge an Bitterstoffen vielfältigster Strukturen wahrzunehmen. Es konnten bisher über einhundert Bitterliganden ihren Rezeptoren zugeordnet werden. Der exakte molekulare Mechanismus der TAS2Rs sowie das Ausmaß, inwiefern sich die Detektion der Bitterstoffe zwischen den Individuen unterscheidet, ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Beckett et al. 2014). TAS2R-Gene wurden außerdem im respiratorischen System und dem Gastrointestinaltrakt gefunden. Die Bedeutung ist bis dato unklar (Ji et al. 2014).

Beispiele für Stimulanzen des Bitter-Rezeptors sind Cycloheximid, Denatonium, Salicin, PTC, Saccharin, Chinin, Strychnin, Atropin oder Koffein (Yarmolinsky et al. 2009).

#### **3.1.3 Zentrale Verarbeitung**

Die Gesamtheit aller Schmeckfasern aus den Hirnnerven Nervus facialis (VII), Nervus glossopharyngeus (IX) und Nervus vagus (X) gelangt wie bereits beschrieben zu den Nuclei tractus solitarii. Hier erfolgt die Umschaltung auf das zweite Neuron. Alle bisher durchgeführten anatomisch-klinischen Studien belegen einen ipsilateralen Verlauf der Hirnnerven zur Pons (Goto et al., 1983, Nakajima et al., 1983, Jyoichi et al., 1985, Uesaka et al., 1998, Onoda et al., 2012). Über den weiteren Verlauf der zentralen Schmeckverarbeitung herrscht in der aktuellen Literatur bisher Uneinigkeit. Shikama und Kollegen beispielsweise beobachteten eine ipsilaterale Minderung des Schmeckvermögens nach Hirnschädigung und leiten davon eine ipsilaterale Projektion der Schmeckfasern von der Pons in das Mittelhirn ab (Shikama et al., 1996); diese Erkenntnis findet sich in weiteren Studien (Goto et al., 1983, Nakajima et al., 1983, Jyoichi et al., 1985, Ito and Suzuki, 1993, Combarros et al., 1994). Im

Gegensatz dazu berichten Lee et al. (Lee et al., 1998) von einer Hemiageusie in drei Fällen: Die kontralaterale Minderung des Schmeckvermögens sei assoziiert mit Hirnläsionen von Abschnitten im oberen Teil der Pons. Dies führt zu der Annahme einer Kreuzung der Schmeckfasern vor Erreichen des Mittelhirns. Onoda et al. (Onoda et al., 2012) führten eine Studie an 38 Patienten mit Schmeckstörungen durch. Hinsichtlich einer Lateralisierung des Schmeckvermögens beobachteten sie bei Patienten mit Läsionen zwischen Medulla und Pons in 82% der Fälle ipsilaterale Schmeckstörungen; bei Läsionen, die sich im Verlauf der Schmeckbahn weiter zentral befanden, ging die Prozentzahl ipsilateraler Störungen zurück, während bilaterale Defizite anstiegen. Dies führt die Autoren, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien (Goto et al., 1983, Nakajima et al., 1983, Onoda and Ikeda, 1999, Onoda et al., 2005), zu der Annahme, dass sich die zentrale Schmeckverarbeitung auf Höhe der oberen Pons teilt und anschließend bilateral zum cerebralen Kortex verläuft.

Die Schmeckfasern gelangen also auf bisher nicht hinreichend geklärtem Weg zum Thalamus, von welchem die Schmeckbahn weiter in den primären gustatorischen Kortex verläuft. Auch die exakte Lokalisation dieses Areals ist nach wie vor nicht sicher bekannt. Studien an Menschen, die auf Läsionen des Gehirns beruhen, berichten von Schmeckstörungen bei Verletzung der rostralen (Pritchard et al. 1999; Cereda et al. 2002) und links posterioren Insula (Cereda et al. 2002) oder allgemeiner in verschiedenen Regionen der Insula (Henkin et al. 1977; Pritchard et al. 1999), aber auch bei Läsionen des parietalen und frontalen Operculums (Hausser-Hauw und Bancaud 1987). In Abhängigkeit von der jeweiligen Untersuchungsmethode (fMRT, PET, MEG oder EEG) wird über neuronale Aktivitäten in verschiedenen Bereichen der Insula sowie dem darüber liegenden Operculum berichtet (Frey and Petrides 1999; Schoenfeld et al. 2004; Ogawa et al. 2005). Auch Dutta et al. zeigen sich unsicher, benennen die Insula und den orbitofrontalen Kortex als Ziele der Projektionsbahnen nach Verarbeitung der Informationen im Thalamus (Dutta et al. 2013). In der aktuellen Literatur wird der primäre gustatorische Kortex in dem anterioren und mittleren Teil der Inselregion vermutet (Iannilli et al. 2014). Hier findet bereits eine Integration mit anderen Sinneseindrücken, vornehmlich Temperatur- und Tastinformationen, statt. Der sekundäre gustatorische Kortex wird im hinteren Teil der Insula angenommen, in den die Signale anschließend weitergeleitet werden (Iannilli et al. 2014). Auch im orbitofrontalen Kortex werden sekundär neuronale Aktivitäten registriert. An dieser Stelle findet eine teilweise Überlappung mit dem sekundären olfaktorischen Kortex statt, was die enge Verbindung von Schmeck- und Geruchssinn erklärt (Trepel 2012). Die Verarbeitung der Schmeckinformationen erfolgt dabei in beiden Hemisphären, wobei eine Dominanz der rechten Hemisphäre angenommen werden kann (Singh et al. 2011).

**Abbildung 1** *Einer der diskutierten Möglichkeiten der zentralen Verarbeitung des Schmeckens (Dutta et al. 2013). Eintritt der Schmeckfasern über die Hirnnerven VII, IX und X zu den Nuclei tractus solitarii. Derzeit nicht sicher belegt (s.o.), evtl. ipsilaterale Weiterleitung über Pons, weiter zum Thalamus (ventroposteriomedialer und dorsomedialer Nucleus). Projektionen der Schmeckbahn in die Insula und den orbitofrontalen Kortex, wobei exakte Lokalisationen Gegenstand aktueller Diskussionen sind.*

### **3.2 Einflussfaktoren auf den Schmecksinn**

#### **3.2.1 Alter**

Das physiologische Altern der Sinnesorgane im Laufe des Lebens ist weitestgehend bekannt und für Sinnesmodalitäten wie Sehen und Hören bereits gut erforscht. Auch das Schmecken und Riechen nehmen mit zunehmendem Alter an Sensibilität ab (Murphy und Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014). Dabei ist nicht jeder Geschmack gleichermaßen betroffen. Insbesondere die Wahrnehmung von bitter und salzig ist im Alter eingeschränkt, das Empfinden von süß und sauer hingegen weniger (Winkler et al. 1999). Es finden sich innerhalb der Sensibilität auf Bitterstoffe jedoch Unterschiede. So bleibt die Wahrnehmung von Harnstoff relativ gut erhalten, wohingegen die Sensitivität auf Chinin deutlich abnimmt (Goodspeed et al. 1987; Murphy und Gilmore 1989; Deems DA et al. 1991; Stevens et al. 1991; Cowart et al. 1994; Ackerman und Kasbekar 1997; Snyder und Bartoshuk 2009). Da besonders ältere Menschen an chronischen Erkrankungen leiden, welche medikamentös therapiert werden müssen, geht man davon aus, dass ein Großteil der Verluste des Schmeckvermögens im Alter auch medikamenteninduziert ist (Imoscopi et al. 2012). Nichts desto trotz ist von einem physiologischen Verlust des Schmeckempfindens im Alter auszugehen (Cowart et al. 1994).

#### **3.2.2 Geschlecht**

In einer Studie aus dem Jahr 2011 (Singh et al. 2011) konnten bei der Applikation gustatorisch evozierter Potentiale der Schmeckrichtungen salzig und umami keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen beobachtet werden. Die Amplitude der Potentiale war bei Frauen dennoch etwas höher. Dies steht im Einklang mit vorangegangenen Studien, in denen Frauen nicht nur eine höhere neuronale Aktivität auf Schmeckstimuli zeigten, sondern auch bei Schmecktests im Allgemeinen besser abschnitten, als Männer (Ahne et al. 2000; Hummel et al. 2010). Hormonelle Einflüsse auf die Sinneszellen des Schmeckens und Riechens sowie auf das trigeminale System werden als Ursache für diese Differenzen diskutiert (Hummel et al. 2010; Singh et al. 2011). In einer weiteren Untersuchung der Geschlechterdifferenz hinsichtlich des Schmeckens fokussierte



man auf die Unterschiede der Verarbeitung im Gehirn einerseits im Hungerzustand, andererseits bei Sättigung der Probanden. Dabei stellte sich eine signifikant höhere Aktivierung der Inselregion, des Thalamus und Hippocampus bei hungrigen Frauen im Vergleich zu Männern bei Applikation des sauren Stimulus dar, die Stimulation mit NaCl konnte im präfrontalen Kortex bei Frauen deutlich höher gemessen werden. Bitterstoffe und Sucrose hingegen zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Waren die Probanden satt, hatten Frauen außer bei der Stimulation mit NaCl immer eine signifikant stärkere neuronale Aktivität. Dabei zeigten diese im Vergleich zwischen Hungerzustand und Sättigung insgesamt geringere Schwankungen, als dies bei Männern der Fall war (Haase et al. 2011).

#### **3.2.3 Andere**

In Folge von Medikamenteneinnahme (Penicillin, Thyreostatika, Vincristin, Vinblastin, Amitryptilin, Cholestyramin) und Zinkmangel (Imoscopi et al. 2012) wurden schädigende Einflüsse auf das gustatorische System beschrieben. Auch Vitaminmangel (Vitamin A und B), Malnutrition, Exsikkose der Zunge, Speichelhyperviskosität (zystische Fibrose), Malignome (oropharyngeale Karzinome), operative Eingriffe und Bestrahlung können Ursachen von Schmeckstörungen sein (Schiffman 1993; Berlit 2006). Zudem verringert Rauchen das Schmeckempfinden, während das Bürsten der Zunge das Schmecken geriatrischer Patienten positiv beeinflusst (Winkler et al. 1999). Nicht zu vergessen sind außerdem neurodegenerative Prozesse, die Zentren der Schmeckverarbeitung im Gehirn involvieren, wie beispielsweise die Parkinson-Krankheit oder ein Schlaganfall. Aktuelle Studien belegen des Weiteren einen Zusammenhang zwischen Adipositas und einer damit assoziierten Abnahme des Riech- und Schmeckvermögens (Skrandies und Zscheschang 2015).

#### **3.3 Psychophysische Untersuchung des Schmecksinns**

Psychophysische Messungen vereinen verschiedene Aspekte der gustatorischen Wahrnehmung. Zum einen die Empfindsamkeit für Schmeckstimuli, andererseits deren hedonische Wertung. Das subjektive psychische Erleben der verabreichten Geschmäcker soll bei dieser Form der Untersuchung in Beziehung gesetzt werden zu den objektiven, physikalischen Reizen als den auslösenden Prozessen. Diese Reaktion wird mithilfe verschiedener standardisierter Fragestellungen gemessen. Hierbei ist die Mitarbeit der Probanden von entscheidender Bedeutung, was gleichzeitig bedeutet, dass die Ergebnisse dieser subjektiven Empfindung vom Patienten oder Probanden problemlos manipuliert werden können. Messungen der Schmeckfähigkeit beinhalten Schwellenwerte, Identifikation

der Schmeckqualitäten und Intensitätsbestimmung. Prinzipiell wird zwischen zwei verschiedenen Testsystemen unterschieden. Zum einen ist es möglich, das lokale Schmeckvermögen zu testen (Nn. VII, IX), zum anderen kann man das Gesamtschmeckvermögen der Probanden prüfen (Nn. VII, IX, X). Im Rahmen dieser Studie machten wir uns als lokalen Test die Schmeckstreifen zunutze, als Gesamtmundtest verwendeten wir die „Schmecksprays“.

#### **3.3.1 Schmecksprays**

Eine unkomplizierte und schnelle Testung des Gesamtschmeckvermögens erreicht man mit den „Schmecksprays“. Diese gibt es in den Schmeckrichtungen süß, sauer, salzig und bitter. Da sich das auf die Zunge applizierte Spray im gesamten Mundraum verteilt, dient dieser Test lediglich einer groben Orientierung und eignet sich damit nicht für eine lokale Eingrenzung von Schmeckstörungen. Die an der vorliegenden Studie teilgenommenen Probanden haben alle vier Schmeckrichtungen zu 100% korrekt identifiziert.

#### **3.3.2 Schmeckstreifen**

Bei dieser Testmethode handelt es sich um einen einfachen, schnell durchführbaren, validierten Schmecktest mit relativ guter lokaler Genauigkeit (Landis et al. 2009). Die kurze Testdauer und Kosteneffizienz sind weitere Vorteile. Als Geschmacksträger nutzt man bereits vorbereitete, in Schmecklösungen (süß, sauer, salzig, bitter) getränkte Filterpapierstreifen in vier verschiedenen Konzentrationen, welche sich die Probanden auf die Zunge legen. Dabei werden die Filterpapierstreifen geschmacklich randomisiert und in aufsteigender Konzentration angeboten. Nachdem sich die Probanden in einem forced-choice-Verfahren auf eine Schmeckrichtung festgelegt haben, spülen sie den Mund mit Wasser, um ihn für den nächsten Schmeckstreifen zu neutralisieren. Am Ende der Testung kann eine Gesamtpunktzahl ermittelt werden, die zur Studienteilnahme einen Wert von 10 nicht unterschreiten sollte (Landis et al. 2009).

### **3.4 Elektrophysiologische Untersuchung**

Elektrophysiologische Untersuchungen basieren auf der Ableitung und Darstellung elektrischer Potentialdifferenzen. Der Begriff subsummiert unter anderem diagnostische Untersuchungsmethoden wie die Elektrokardiographie (EKG), die Elektromyographie (EMG) oder die Elektroneurographie (ENG). Eine weitere Methode ist die Elektroenzephalographie (EEG), welche Potentialveränderungen im Gehirn erfasst. In der Erforschung zentralnervöser Informationsverarbeitungsprozesse sowie der Diagnostik zentralnervöser Abläufe spielt die

Ableitung so genannter evozierter Potentiale mithilfe des EEGs schon seit vielen Jahren eine Rolle.

### **3.4.1 Evozierte Potentiale**

Evozierte (auch: ereigniskorrelierte) Potentiale sind bewusst hervorgerufene Potentialänderungen im Gehirn durch Stimulation eines peripheren Nervs oder eines Sinnesorgans. Sie bewegen sich in einer Größenordnung von wenigen Millionstel Volt. Spontane EEG-Schwankungen sind dagegen deutlich höher. Um evozierte Potentiale im EEG ableiten zu können, müssen die sie auslösenden Reize wiederholt dargeboten und durch Mittelungsverfahren berechnet werden (s. 3.4.3 Technischer Hintergrund). Nach wie vor beschäftigt sich ein großer Teil der Forschung damit zu verstehen, wie genau die Informationen innerhalb unseres Gehirns fließen und welche Verbindungen zwischen den einzelnen Regionen bestehen. Die Erkenntnisse sind dabei so fortgeschritten, dass evozierte Potentiale seit geraumer Zeit zur klinischen Diagnostik visueller, auditorischer und chemosensorischer Modalitäten genutzt werden (Murphy et al. 2000). Der Anblick eines bestimmten Bildes führt nach 1/10 s zu einer Erregung der im Hirn für die Sehreizwahrnehmung zuständigen Nervenzellen. Diese im Kortex und in subkortikalen Strukturen entstehenden elektrischen Potentiale aufgrund der Reizung des visuellen Systems werden als visuell evozierte Potentiale (VEP) bezeichnet. VEPs können durch Helligkeits- und Mustersimulation erzeugt werden. Als objektive Hörtests finden otoakustische Emissionen sowie evozierte Hirnstammpotentiale routinemäßig Anwendung in der Klinik, etwa um das Neugeborenen-Hörscreening durchzuführen, um grobe Hörverluste bei Kindern zu erfassen oder zur Erkennung von Akustikusneurinomen und Hirnstammtumoren. Die Funktionsfähigkeit sensibler Nervenbahnen lässt sich mithilfe somatosensibel evozierter Potentiale (SEP) prüfen. Periphere Nerven werden z.B. an Hand oder Fuß elektrisch stimuliert und die Impulse dann von der Kopfhaut abgeleitet. Die Methode wird zur Abklärung von Gefühlsstörungen eingesetzt, wie sie z.B. bei Bandscheibenvorfällen, Multipler Sklerose oder Rückenmarkserkrankungen vorkommen. Auch die Messung chemosensorisch ereigniskorrelierter Potentiale gehört mittlerweile in einigen Kliniken zur Routinediagnostik von Riechstörungen. Bei den chemosensorisch ereigniskorrelierten Potenzialen unterscheidet man zwischen olfaktorisch ereigniskorrelierten Potenzialen, welche durch rein olfaktorische Stimuli erzeugt werden und chemosomatosensorisch ereigniskorrelierten Potenzialen, welche durch Reizung des Nervus Trigeminus entstehen. Neben der vielfältigen Anwendung evozierter Potentiale zur Objektivierung der Sinnesmodalitäten in der klinischen Routine ist es auffällig, dass dies bei Patienten mit Schmeckstörungen bisher nur selten Anwendung findet.

### 3.4.2 Gustatorisch ereigniskorrelierte Potentiale

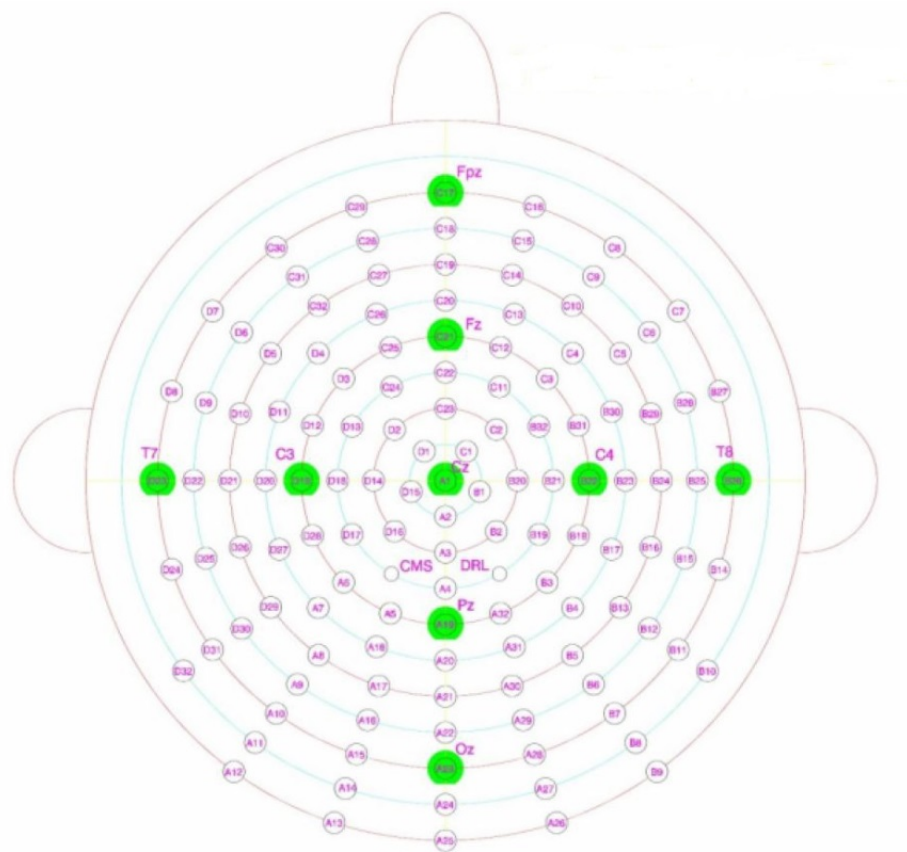
Erstmals konnten gustatorisch ereigniskorrelierte Potentiale (GEKP) 1971 von Funakoshi und Kawamura nachgewiesen werden (Funakoshi und Kawamura 1971; Schaupp 1971). 1985 entwickelte Kobal eine Apparatur zur spezifischen Reizdarbietung (Kobal 1985). Im Verlauf gelang es Min und Sakamoto 1997 mit einer weiteren Entwicklung der Messanordnung bereinigte Peakzeiten zu gewinnen. Seitdem ist bekannt, dass GEKP auf die vier Basisqualitäten süß, sauer, salzig und bitter nach circa 150 bis 200 ms ausgelöst werden und das somatosensible Potential auf den Zungenkontakt mit dem Kontrollspeichel nach etwa 50 ms auftritt (Min und Sakamoto 1998). Die Schwierigkeit in der Ableitung und Aufzeichnung gustatorisch evozierter Potentiale lag seit jeher in der Darstellung reiner GEKP, ohne gleichzeitig aktivierte somatosensible Fasern zu erfassen. Die Herausforderung bestand und besteht im Ausschluss annehmbarer Potentiale für taktile Reize, das Temperaturempfinden und Bewegungsartefakte, die den reinen gustatorischen Reiz umgeben. Die Präzision der Reizapplikation gelang mit Hilfe des sog. Gustometers, dessen Funktionsweise im Abschnitt Material und Methoden detailliert beschrieben wird. Hinzu kommt die Bedingung, eine genügend große Anzahl an Stimuli zu wählen, um ein GEKP klar herausfiltern zu können und ein ausreichend langes Interstimulusintervall, welches aufgrund der Adaptation benötigt wird. Damit wird die Untersuchung im Gegensatz zu anderen Sinnesmodalitäten stark erschwert.

### 3.4.3 Technischer Hintergrund

Die Neuronen unseres Gehirns erzeugen eine niederfrequente Spannung, deren Schwankungen an der Schädeloberfläche in Form eines EEGs abgeleitet werden können. Ohne spezifische Reizeinwirkung stellt sich als Folge der postsynaptischen exzitatorischen und inhibitorischen Potentiale von Neuronen das so genannte Ruhe-EEG dar. Zur klinischen Bewertung werden Amplitude und Frequenz eines EEGs herangezogen, deren Bereiche für gesunde Menschen klar definiert sind. Die Amplituden der Spannungen liegen im Spontan-EEG in einem Bereich von 10 bis 150  $\mu$ V. Entsprechend der Vigilanz des Patienten liegt die Frequenz zwischen 1 und 40 Hz. In entspannter Wachheit mit geschlossenen Augen werden die Signale in einem Bereich von 8-13 Hz als Alpha-Wellen bezeichnet. Werden die Augen geöffnet oder befindet man sich im REM-Schlaf verschieben sich die Frequenzen zum Beta-Bereich (14-30 Hz), die Amplituden nehmen ab. Delta-Wellen (0,1 bis <4 Hz) finden sich beim Erwachsenen in der Tiefschlafphase, bei Säuglingen und Kindern physiologischerweise auch im Wachzustand. Als Theta-Welle wird ein Signal im Frequenzbereich zwischen 4 und

<8 Hz bezeichnet. Auch diese sind bei Kindern im Wach-EEG normal, im Erwachsenenalter bei Gesunden nur in der Phase des leichten Schlafes abzuleiten.

Das Gehirn reagiert auf Reize mit neuronalen Reaktionen im Sinne von elektrischen Potentialen spezifischer Form und Latenz, den evozierten oder ereigniskorrelierten Potenzialen, welche mittels der Elektroenzephalographie abgeleitet werden. Es handelt sich um ortsspezifische Spannungsänderungen, die die Darstellung des zeitlichen Zusammenhanges zu einem applizierten Reiz ermöglichen. Art und Höhe der Spannungsänderung sind reizspezifisch. Nachweisbar werden evozierte Potentiale bei Aktivierung ausreichend großer Neuronenverbände, da die Potentialänderung erst dann aus dem Grundrauschen extrahierbar ist. Aufgrund ihrer geringen Amplitude sind sie allerdings nur durch reizsynchrone Summation und Mittelung von EEG-Abschnitten darstellbar. Da spezifische aufeinander folgende Reize, wie beispielsweise ein bitterer Geschmack, Antwortpotentiale mit einem ähnlichen zeitlichen Verlauf liefern, kommt es zu einer Kontrastverstärkung in dem sonst unregelmäßigen Spontan-EEG. Es hat sich etabliert, die im EEG entstehenden sichtbaren Änderungen nach Polarität, Latenz und Ort der Ableitung einzuteilen. So bezeichnet man positive Potentialänderungen mit P, negative Auslenkungen mit einem N. Es folgt die Nummerierung entsprechend der Reihenfolge ihres Auftretens. Der erste positive Ausschlag wird somit als P1, der dritte Negative als N3 bezeichnet. Zusätzlich kann der Richtung des Ausschlages (P oder N) die Latenzzeit in Millisekunden beigefügt werden. P140 entspricht demnach einem positiven Gipfel 140 ms nach Reizbeginn. Nach dem Zeitpunkt des Sichtbarwerdens, der Latenzzeit, unterscheidet man frühe, mittlere und späte Potentialkomponenten (Pratt et al. 1999; Schmidt und Lang 2007). Es ist bekannt, dass physikalische Reizparameter, zum Beispiel Helligkeit bei visuell evozierten Potentialen, vor allem Einfluss auf die frühen und mittleren (auch als exogen bezeichnete) Komponenten eines Potentials haben. Sie treten bis etwa 100 ms nach Reizbeginn auf. Potentialmaxima sind über den Hirnarealen ableitbar, die durch den spezifischen Reiz erregt werden. Für den Ort der Ableitung werden die Buchstaben Z für zentral, F für frontal, P für parietal, T für temporal und O für occipital verwendet. Klassischerweise wird diese hier beschriebene Methode der EEG-Analyse gewählt, welche für die Verwendung einer geringen Anzahl von Elektroden gut geeignet ist. Das für diese Dissertation verwendete 128-Kanal-EEG wurde auf die unter Abschnitt 4.8. beschriebenen Art und Weise, und damit abweichend von der klassischen Methode, analysiert. **Abbildung 2 *Elektrodenposition 128-Kanal-EEG (Elektrodenposition entsprechend des internationalen 10/20-Systems; Biosemi, Amsterdam, Niederlande)*** gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Studie verwendeten Elektrodenpositionen.



**Abbildung 2** Elektrodenposition 128-Kanal-EEG (Elektrodenposition entsprechend des internationalen 10/20-Systems; Biosemi, Amsterdam, Niederlande)

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Studiendesign

Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer prospektiven Studie und wurde in zwei Einzelsitzungen zu je 50 Minuten realisiert, denen ein einmaliger etwa 30-minütiger Termin zur Eignungsprüfung der Probanden vorausging. Die Studie erfolgte nach den in der Erklärung von Helsinki verankerten ethischen Prinzipien (World Medical Association 1997). Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden (Bearbeitungsnummer: EK286112008), konnte die Durchführung der Testung von März bis Juli 2013 erfolgen. Probanden, welche an allen Messungen teilnahmen, wurden in einem zeitlichen Abstand von durchschnittlich 2 Wochen (Minimum: 3 Tage, Maximum: 12 Wochen) getestet.

### 4.2 Probanden

Vor Beginn der Studie wurden Ein- und Ausschlusskriterien der Probanden festgelegt. Eingeschlossen wurden 96 sowohl weibliche als auch männliche Probanden im Alter von 18 bis 70 Jahren, die weder das Schmeckvermögen beeinträchtigende Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen, Demenz), relevante Vorerkrankungen im HNO-Bereich, noch Alkohol- oder Drogenmissbrauch (Nikotin eingeschlossen) angaben. Eine vorliegende Schwangerschaft oder Stillzeit führten ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie. Die Rekrutierung der Teilnehmer erfolgte über Aushänge. Jede/r StudienteilnehmerIn wurde ausführlich über das Design der Studie aufgeklärt und erklärte seine/ihre freiwillige Teilnahme mündlich und schriftlich. Die Teilnahme an der Studie konnte jederzeit abgebrochen werden. Die Einteilung der Probanden erfolgte in vier Altersgruppen ((a) 18-30 Jahre, (b) 31-44 Jahre, (c) 45-60 Jahre, (d) 61-70 Jahre), um altersabhängige Unterschiede in der Schmeckverarbeitung nachvollziehen zu können. Die Anzahl und Verteilung der Probanden in den jeweiligen Altersklassen entnehmen Sie bitte Tabelle 2 **Altersverteilung der Probanden** in Abschnitt 5.1 Probandenkollektiv – deskriptive Statistik.

### 4.3 Verwendete Schmeckstoffe

Zur Applikation der Stimuli auf die Zungen der Probanden wurden fünf Schmeckrichtungen in gelöster Form verwendet: salzig (sodium chloride – NaCl, CAS Nummer: 7647-14-5, Bestellnummer: S7653), süß (saccharin -  $C_7H_5NO_3S$ ; CAS Nummer: 81-07-2; Bestellnummer: 240931), sauer (citric acid monohydrate -  $C_6H_8O_7$ , CAS Nummer: 5949-29-1,

Bestellnummer: C1909), bitter (quinine hydrochloride -  $C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl$ , CAS Nummer: 6119-47-7, Bestellnummer: Q1125) und umami (MSG = L-glutamic acid monosodium salt monohydrate -  $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$ , CAS Nummer: 6106-04-3, Bestellnummer: 49621) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Die Lösung erfolgte mit Wasser für Injektionszwecke (Aqua ad injectabilia. B.Braun, Braun AG, Melsungen, Deutschland). Die zur Erkennung der Stimuli optimale Reizkonzentration für die fünf verschiedenen Schmeckrichtungen wurde vorab in einer separaten Studie ermittelt. Die Lösungen waren stets bei 4°C gelagert bevor sie im Gustometer auf die gewünschte Temperatur von 37°C (Körpertemperatur) erwärmt wurden. Tabelle 1 **Verwendete Schmeckstoffe** zeigt die zur Herstellung der Schmecklösungen verwendeten Stoffe und Konzentrationen.

Tabelle 1 Verwendete Schmeckstoffe

<b>Geschmack</b>	<b>c (mM)</b>	<b>PM (g/mol)</b>	<b>C (g/l)</b>
süß (Succhrose)	3,6067206	183,18	0,66067908
sauer (Zitronensäure)	40,0350877	192,13	7,6919414
salzig (Natriumchlorid)	347,682386	58,44	20,3185587
bitter (Chinin)	0,74361081	360,88	0,26835427
umami (Natrium- Glutamat)	426,804511	169,1	72,1726429

#### 4.4 Das Gustometer

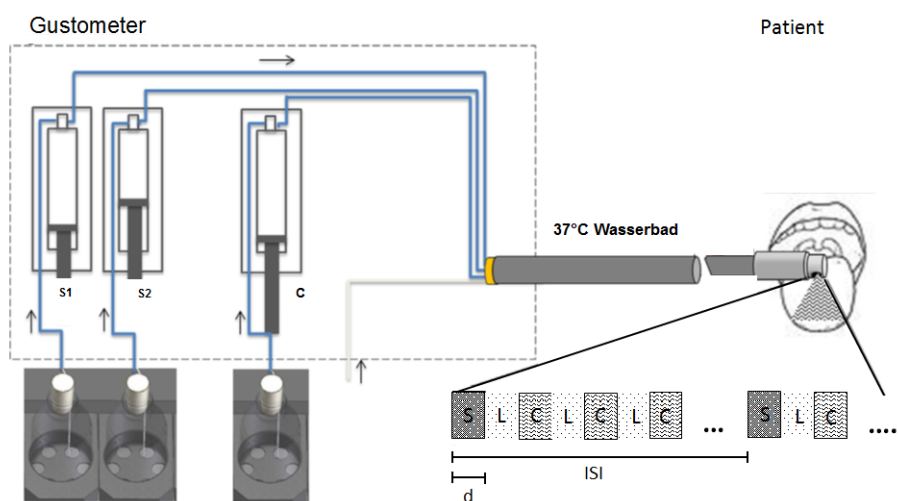
Der Fortschritt bezüglich der Kenntnis über die zerebrale Verarbeitung von Schmeckreizen scheiterte bisher vor allem an den Kontrollmöglichkeiten der verabreichten Stimuli (Ohla et al. 2012). Die Anforderungen an eine geeignete Apparatur reichen von der Präzision der Applikation im Millisekundenbereich über ein exaktes Interstimulusintervall bis hin zu einer definierten Konzentration der Reizstärke. Die Problematik in der Messung gustatorisch evozierter Potentiale liegt zudem in der Innervation der Zunge, die zahlreiche Reize miteinander vereint. Die Apparatur muss gewährleisten, dass eine Stimulation des Druck- und Temperaturempfindens sowie Bewegungsartefakte bestmöglich ausgeschlossen werden, um eine reine Antwort des gustatorischen Reizes zu erhalten. Unter Berücksichtigung all dieser Aspekte erfolgte die Applikation der Schmeckstoffe auf die Zungen der Probanden mithilfe einer computergesteuerten Anlage, die im Folgenden als Gustometer bezeichnet wird (GU001, Burghart, Wedel, Deutschland). Diese Apparatur ist in



der Lage, gepulste Stimuli mit einer Dauer von 250 ms und einem Volumen pro Puls von 100  $\mu\text{l}$  zu applizieren. Das Interstimulusintervall (ISI, im Mittel 20 s) wurde dabei in der vorliegenden Studie von 18 bis 22 s randomisiert, um eine zeitliche Erwartung des nächsten Reizes zu verhindern. Die Reize wurden in einen gepulsten Fluss neutraler Flüssigkeit (Aqua ad injectabilia. Braun, Deutschland) gebettet, sodass die Zunge ständig einem Stimulus ausgesetzt ist. Dieser hat eine Temperatur von 36°C, was der Körpertemperatur entspricht und somit eine Wahrnehmung des Reizes durch Temperaturunterschiede zwischen Flüssigkeit und Zunge unterbindet. Diese periodische Präsentation flüssiger Impulse garantiert eine Habituation des sensorischen Empfindens, wobei das gustatorische System von dieser Desensitivierung ausgespart bleibt (Kobayakawa et al. 1996; Singh et al. 2011). In Zusammenschau aller Bedingungen resultiert daraus schließlich eine rein gustatorische Reizantwort (Singh et al. 2011).



**Abbildung 3** Das Gustometer mit den fünf vorbereiteten Schmecklösungen: salzig, sauer, süß, bitter und umami. Ein künstlicher Speichel (Aqua ad injectabilia) wurde genutzt, um die Zunge zu spülen und anzufeuchten.



**Abbildung 4** Anlage (Gustometer) mit computergesteuerten Spritzenpumpen. Schmecklösungen wurden aus den Glasflaschen in Spritzenpumpen gesaugt, über Schlauchsystem durch Wasserbad (37°C) geleitet. Am Auslass des Gustometers gepulste

*Stimulation der Zunge mit Schmecklösungen (S1 und S2) in einem Fluss neutraler Kontrollflüssigkeit (C). Darbietung in einem kontinuierlichen Luftstrom (L). Pulsdauer (d) betrug 250 ms, Pulsvolumen 100 µl, ISI randomisiert 18-22 s.*

#### 4.5 EEG Ableitung

Bevor die Probanden schließlich ihre Position an dem Messplatz einnahmen, erfolgte die Anlage des EEG-Systems (Biosemi; Elektroden: Ag-AgCl active-electrodes, BioSemi; 10/20 BioSemi CAP; Amsterdam, NL). Hierfür wurde der Schädel sowohl von Tragus zu Tragus, als auch von Glabella bis Protuberantia occipitalis vermessen, um die passende Elektrodenhaube auswählen zu können. Dabei konnte aus drei verschiedenen Größen gewählt werden: S (52-56 cm), M (54-58 cm), L (56-60 cm). Diese wurde dem Teilnehmer aufgesetzt, wobei auf einen festen Sitz der Haube zu achten war. Acht externe Elektroden wurden zudem nach Reinigung der Haut angebracht, um vertikale und horizontale Augenbewegungen zu messen (Elektrookulogramm, EOG), sowie zwei Paar Referenzelektroden an den Ohrläppchen und dem Mastoid beidseits. Nach erneuter Überprüfung des korrekten Sitzes der Haube mit der Elektrode A1 im Zentrum der Messpunkte konnte ein Elektrodengel (Signa gel, Parker laboratories, Inc. Fairfield, New Jersey) aufgetragen und die 128 Elektroden in ihrer entsprechenden Position fixiert werden. Das Gel dient hierbei der Erhöhung der Konduktivität und Reduktion der Impedanz. Jeder Kanal wurde verstärkt (BioSemi Active Two AD-box) und mittels eines Glasfaserkabels zu einem USB2 Receiver gesendet (BioSemi), welcher mit einem Computer verbunden war. Schließlich wurden die Daten mit Hilfe einer Software (BioSemi ActiveView 605) registriert und gespeichert. Die Sampling-Frequenz wurde auf 512 Hz festgelegt.

Die Umgebungsgeräusche wurden minimiert und den Probanden ein weißes Rauschen (eine Mischung aller Frequenzen mit derselben Lautstärke) über Kopfhörer mit einer Lautstärke von 70 dB eingespielt, um akustische Artefakte im EEG zu vermeiden, sowie das Klicken des Gustometers bei Reizabgabe zu maskieren. Durch Augenzwinkern oder Vigilanzminderung verursachte Artefakte sollten mit Hilfe eines einfachen Computerspiels vermieden werden, welches der Proband während der EEG-Aufzeichnung spielte. Allein durch leichte Augenbewegung sollte ein sich randomisiert bewegendes größeres Quadrat verfolgt und mithilfe einer gewöhnlichen Computermouse stets ein weißer Punkt in dieses manövriert werden.

## **4.6 Vorbereitung der Probanden**

### **4. 6.1 Testung des Schmeckvermögens**

Eines der Einschlusskriterien zur Studienteilnahme war das uneingeschränkte Schmeckvermögen der Probanden. Um dies beurteilen zu können wurden am ersten Studientag alle Teilnehmer einer psychophysischen Testung unterzogen, wobei als Schmecktests zum einen Schmeck-Sprays sowie der standardisierte Test mit Schmeckstreifen (Mueller et al. 2003; Landis et al. 2009; Schuster et al. 2009) zum Einsatz kamen. Da diese Tests den Geschmack umami nicht inkludieren, wurde dieser mittels am Testtag selbst hergestellter Testlösung angeboten. Alle in der Studie eingeschlossenen Probanden hatten Testwerte im Normbereich.

### **4.6.2 Testung des Riechvermögens**

Die Testung des olfaktorischen Systems wurde mit den sogenannten 'sniffin' sticks durchgeführt, einem validierten Verfahren, das durch den Vergleich mit altersspezifischen Normwerten eine klinische Diagnosestellung ermöglicht (Kobal et al. 1996; Hummel et al. 2007b). Die Studienteilnehmer zeigten alle ein Riechvermögen im Normbereich.

### **4.6.3 Wortschatztest**

Jeder Studienteilnehmer wurde vorab auch einem Wortschatztest unterzogen. Dieses klinisch-psychologische und neuropsychologische diagnostische Mittel ermöglicht die schnelle Einschätzung des verbalen Intelligenzniveaus und die Beurteilung des Sprachverständnisses bei Probanden und Patienten ab 16 Jahren. Außerdem dient er der Abschätzung des prämorbidem Intelligenzniveaus bei leichter bis mittelschwerer hirneingetragener Beeinträchtigung, zum Beispiel der Demenz, welche als Ausschlusskriterium für Studienteilnehmer gilt. Der Wortschatztest besteht aus 40 Aufgaben zur Wiedererkennung von Worten. Jede der 40 Testaufgaben enthält je ein reales Zielwort und fünf ähnliche nicht existente Wortneubildungen. Die Aufgaben sind zeilenweise in der Reihenfolge steigender Schwierigkeit angeordnet. Der Proband hat die Aufgabe, das Zielwort in jeder Zeile herauszufinden und zu streichen. Eine zeitliche Beschränkung gibt es dabei nicht. Die Testleistungen können als weitgehend altersunabhängig gelten ( $r=0,08$ ) und steigen bei höheren Schul- und Berufsabschlüssen an ( $r=0,60$ ). Normwerte liegen bei  $\geq 27$  Punkten (Schmidt, K.-H. und Metzler, P. 1992).

#### 4.6.4 Vorbereitung der Probanden

Nach Auswahl der Studienteilnehmer und Sicherstellung der Eignung für unsere Testung erfolgte eine ausführliche Unterrichtung der Probanden und Patienten über den Ablauf der Studie. Dazu wurde jeder Teilnehmer mit dem Messplatz vertraut gemacht und der Versuchsaufbau erklärt. Am ersten Studientag erfolgte bereits eine Probesitzung mit Einnehmen der Sitzposition am Gustometer, Durchführung des Computerspiels, Einspielen des weißen Rauschens und einer ersten orientierenden Applikation der fünf Schmeckrichtungen. Wurde der Ablauf verstanden und korrekt durchgeführt erfolgten die Messungen an zwei weiteren vereinbarten Studientagen. Hierbei hatten die Teilnehmer dafür Sorge zu tragen, dass eine Stunde vor der Messung nicht gegessen, getrunken oder geraucht wird und die Haare frei von Lacken, Sprays, Spülungen oder ähnlichem sind. Bevor die Messungen an Termin zwei und drei beginnen konnten, wurde das EEG-System in oben beschriebener Art und Weise angelegt. Waren alle 128 Kanäle sowie acht externe Elektroden fixiert, nahm die Testperson eine für sie bequeme Sitzposition vor dem Gustometer ein. Wichtig dabei war vor allem eine möglichst entspannte Körperhaltung, um Muskelartefakte in der Aufzeichnung der Hirnströme zu vermeiden. Der Blick wurde dem etwa 1,5 m entfernten Monitor zugewandt, der sich auf Augenhöhe befand. Auf diesem hatten die Teilnehmer die Aufgabe, das Computerspiel zu spielen und deren Aufmerksamkeit ausschließlich darauf zu richten. Auf diese Weise war es möglich, alle Teilnehmer denselben definierten visuellen Reizen auszusetzen und stärkere Augenbewegungen, welche EEG-Artefakte induzieren können, auf ein Minimum zu reduzieren. Eine stabile, reizarme Umgebung wurde weiterhin durch das akustische Abschirmen mittels weißen Rauschens und Abdunkelung des Raumes erreicht. Waren alle Einstellungen abgeschlossen, konnte die Messung beginnen.



**Abbildung 5** Position der Probanden während der Messung. Die Zungenspitze der Probanden bleibt während der gesamten Aufzeichnung etwa 5 cm vor dem Auslass des Gustometers. Die Applikation der Stimuli erfolgt mit einem Druck von 0,5 bar.

## **4.7 Versuchsablauf**

### **4.7.1 Aufzeichnung der evozierten Potentiale**

Die Aufzeichnung des reizsynchrone EEGs wurde kontinuierlich mit Hilfe einer Software (BioSemi ActiveView 605) registriert und gespeichert. Die Digitalisierung erfolgte mit einer Abtastrate von 512 Hz. Die Dauer einer jeden Sitzung betrug pro Proband 50 Minuten mit einer geplanten Pause nach etwa 25 Minuten. In dieser Zeit hatten die Versuchsteilnehmer die Gelegenheit, ihre Muskeln zu entspannen sowie Wasser zu trinken. War die Vigilanz der Probanden eingeschränkt oder nahm die Konzentrationsfähigkeit noch vor Ablauf der 25 Minuten ab, wurden individuelle Pausen eingelegt. Wie unter 4.5 EEG Ableitung bereits genauer beschrieben, erfolgte die Weiterleitung der Daten über ein Glasfaserkabel an einen Computer, an welchem die Daten mittels BioSemi ActiveView 605 in Echtzeit dargestellt und gespeichert wurden. Anhand dieser Darstellung konnte die Güte der Ableitung der Elektroden noch vor Ort eingesehen und die Elektrodenpositionen gegebenenfalls vor Beginn der Aufzeichnungen korrigiert und damit optimiert werden. Diese Sitzung à 50 Minuten wurde pro Proband zweifach durchgeführt, sodass in Summe 60 Stimuli pro Schmeckrichtung auf die Zunge eines jeden Teilnehmers appliziert werden konnten. Nach Abschluss der Aufzeichnungen erfolgte die Analyse der EEGs.

## **4.8 Analyse der EEGs**

Nach Beendigung der Versuchssitzungen erfolgte die Auswertung der Daten mit Cartool Software (functional brain mapping lab, version 3.52). Die Analyse der EEGs erfolgte in mehreren Teilschritten, welche im Folgenden im Detail erläutert werden. Die Rohdaten wurden für die Bearbeitung vorbereitet, indem Signalanteile offline gefiltert wurden (Tiefpass 15 Hz, Hochpass 0,10 Hz). Frequenzen von 50 Hz (Störfrequenzen aus der Umgebung) wurden geglättet. Die 500 ms vor jedem Reiz, die sog. pre-trigger period, diente der Ermittlung der zugehörigen baseline.

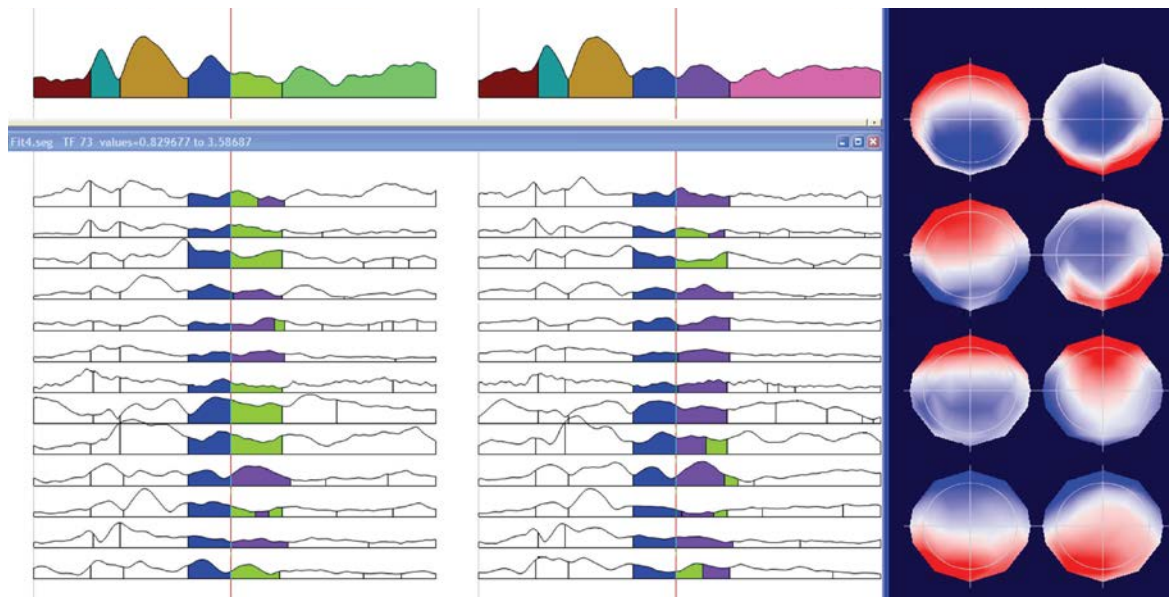
### **4.8.1 Abschnittsbildung, Reduktion von Artefakten und Mittelung der EEG-Daten**

Die wichtigsten Schritte zur weiteren Verarbeitung der erhaltenen Daten waren die Filterung der für die Analyse relevanten Bereiche aus der Gesamtheit der aufgezeichneten Daten sowie deren Mittelung. Zunächst erfolgte für alle abgeleiteten Kanäle eines jeden Probanden eine Abschnittsbildung. Es wurden die Segmente vom Beginn eines Reizes bis 700 ms nach dem Stimulus gewählt und ausgeschnitten. Folglich ist die Auswahl der anschließend analysierten EEG-Abschnitte zeitlich direkt an den Stimulus des gustatorischen Ereignisses gebunden. Anschließend konnte die Überprüfung dieser Segmente auf Bewegungs- und

Zwinkerartefakte erfolgen, welche gegebenenfalls gelöscht wurden, sodass diese unsauberen Signale nicht in die Mittelung einfließen. Mithilfe des EOG konnten diese Abschnitte detektiert und in Folge eliminiert werden. Gefolgt waren diese Schritte von einer Interpolation der schlecht abgeleiteten Elektroden. In der Analyse der Daten wurden Artefakte sichtbar, die problemlos erkannt und folglich entfernt werden konnten. Zudem gab es kleinste Unregelmäßigkeiten, in dessen Folge die Datenauswertung hätte verfälscht werden können. Mittels Interpolation konnte deren Extraktion realisiert werden.

#### 4.8.2 Microstate segmentation

Sind die Aufzeichnungen auf diese Weise vorbereitet, kann die sog. *microstate segmentation* erfolgen. *Microstates* entsprechen einem einheitlich innervierten neuronalen Netzwerk, welches einem charakteristischen Muster folgt: für einige Millisekunden bleibt die neuronale Aktivierung an einem Ort des Gehirns stabil, bis es sich abrupt ändert, um dann wieder stabil zu bleiben (Brunet et al. 2011). In der EEG-Analyse ist dies in einem charakteristischen Muster zu reproduzieren, was zum Konzept der *functional microstates* führte. Damit ergeben hintereinander aktivierte Hirnareale (im Folgenden als *map* bezeichnet) den Weg, der die Informationsverarbeitung beschreibt. Dies passt gut zu der Annahme, dass sich neurokognitive Netzwerke aus immer wieder stabilen Positionen ergeben und nicht auf einem kontinuierlichen Fluss neuronaler Aktivität beruhen (Brunet et al. 2011). Bezugnehmend auf die gERPs bedeutet das, jeder *microstate* repräsentiert einen spezifischen Verarbeitungsschritt, der zwischen Stimuluswahrnehmung und Reaktion liegt. Es werden mehrere dieser beschriebenen *maps* (stabilen Positionen) aus dem vorliegenden Datensatz berechnet. *Cluster maps* werden farbig in Form einer zweidimensionalen Darstellung der Schädeloberfläche wiedergegeben (Abbildung 6, rechts im Bild). Hierbei betrachtet man den Schädel von oben, sodass der obere Bildrand nach nasal und der untere Rand des Bildes nach occipital gerichtet ist. Rechts und links entsprechen im Bild der Realität und sind nicht seitenverkehrt dargestellt. Die Farbgebung kommt infolge der Potentialänderungen der Neuronen zustande, die sich im Mikrovoltbereich bewegen. Dabei bedient sich Cartool eines Farbspektrums, welches sich von einem negativen (blau dargestellt) über 0  $\mu\text{V}$  (weiß) bis in einen positiven Mikrovoltbereich (in der Abbildung rot) bewegt. Schließlich werden diese verschiedenen *maps* des Gehirns jedem einzelnen Zeitpunkt der Messung zugeordnet. Das Ergebnis der *microstate segmentation* sind farbkodierte Flächen unter einer GFP-Kurve (global field power), wobei mit jeder Farbe entsprechende Lokalisationen des Gehirns dargestellt werden. Die GFP entspricht der Standardabweichung der Potentiale aller Elektroden einer gemittelten Referenz-*map*.



**Abbildung 6** *microstate segmentation*: farbig codierte Segmente werden unter den GFP-Kurven dargestellt. Verschiedene Farben kennzeichnen verschiedene Segmente. Die cluster maps dieser Segmente sind auf der rechten Seite dargestellt. Indem man die cluster maps für die ERPs der einzelnen Probanden erstellt, kann man die gefundenen Ergebnisse statistisch überprüfen (Brunet et al. 2011).

Die verschiedenen Farben kennzeichnen unterschiedliche Segmente. Die entsprechenden maps dieser Segmente sind auf der rechten Seite oben dargestellt. Anhand dieser Darstellung ist es möglich, mehrere Bedingungen miteinander zu vergleichen, sei es z.B. hinsichtlich der Länge einer *cluster map* oder deren Abfolge innerhalb einer Kondition (z.B. süß).

#### 4.8.3 Microstate fitting

Die graphische Darstellung neuronaler Aktivität infolge eines beispielsweise gustatorischen Stimulus erlaubt dem Untersucher Hypothesen über die Informationsverarbeitung im Gehirn für verschiedene Bedingungen (etwa Schmeckrichtungen). Die Resultate der *microstate segmentation* nehmen Bezug auf die Gesamtmittelwerte der Daten, weshalb dies noch nicht als endgültiges Resultat gesehen werden kann. Ein weiterer statistischer Test, das *microstate fitting*, schließt sich an, um die erstellten Hypothesen zu stützen und genau die *microstates* zu definieren, die schließlich statistisch signifikant sind. Das Prinzip gleicht dem der *microstate segmentation*, allerdings werden die Berechnungen nun nicht für den Gesamtmittelwert, sondern für jedes individuelle EKP eines jeden Probanden und für alle Bedingung kalkuliert.

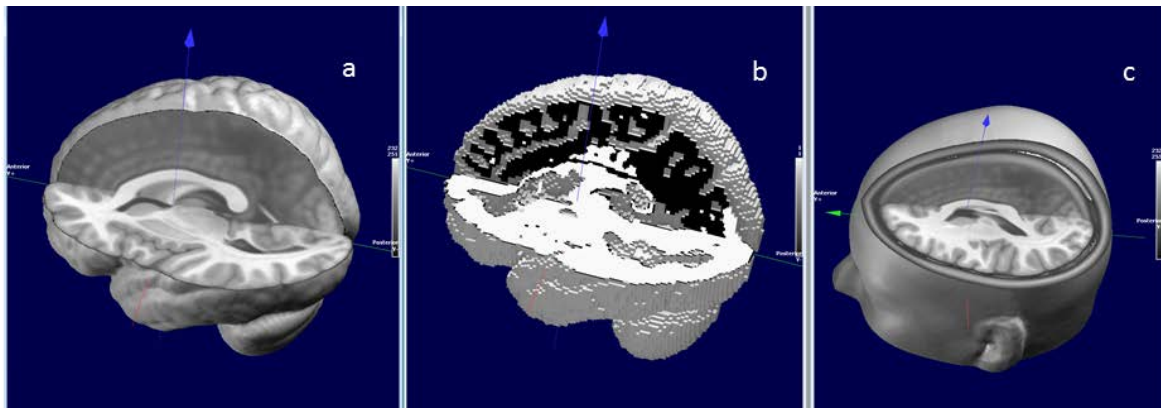
#### 4.8.4 Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität (source localisation)

Die Analyse der Elektroden der Kopfhaut hat den Vorteil, die gesamte elektrische Gehirnaktivität zu berücksichtigen; dennoch ist kein direkter Rückschluss auf die Anzahl und Lokalisation der intrakraniellen Generatoren möglich. Sollen diese Quellen nun erschlossen werden, sind *inverse solution*-Methoden notwendig. Die Cartool Software ist in der Lage, inverse Matrizen für einige der gebräuchlichsten *inverse solution*-Methoden zu berechnen. Zu diesen Methoden gehören die WMN (weighted minimum norm solution), LORETA (low resolution electromagnetic tomography), LAURA (local autoregressive average) sowie EPIFOCUS. In der hier vorliegenden Studie erfolgte die *inverse solution* mit LAURA. Bevor letztendlich eine räumliche Darstellung des Gehirns in drei Ebenen erfolgen kann, werden die inversen Matrizen mit den EEG-Daten multipliziert, um sie für jeden Zeitpunkt graphisch darstellen zu können. Es wird damit folglich die Abschätzung einer dreidimensionalen „Verteilung“ neuronaler Aktivität im gesamten Gehirn zu jeder Zeit ermöglicht. Abhängig von der Größe des Gehirns werden innerhalb der grauen Substanz 3000 bis 5000 Auflösungspunkte mit gleichem Abstand definiert; dabei werden tiefere Hirnstrukturen wie Amygdala, Hippocampus und Thalamus inkludiert. Wir verwendeten folgendes 3D-Gitter mit 5000 Auflösungspunkten.

#### **Abbildung 7** 3D-Gitter mit 5000 Auflösungspunkten

Die resultierenden Ergebnisse werden dreidimensional, der Anatomie des Gehirns entsprechend, dargestellt und können in Form gewünschter Schnittbilder, aber auch als Darstellung der Hirnoberfläche abgebildet werden. Der Anwender hat die Möglichkeit, eigene MRT-Bilder einzuspeisen oder Vorlagen zur Darstellung des Gehirns zu verwenden. Des Weiteren ist in der Software die Option vorgesehen, das vorhandene Modell der grauen Substanz an die individuellen Bedürfnisse anzupassen, beispielsweise den Hirnstamm zu entfernen, falls dieser für die Darstellung der erhobenen Daten nicht erforderlich ist.





**Abbildung 8** MNI Kopf-Vorlage: Standard Modell des Gehirns, welches von Cartool Software genutzt wird, um die inverse solution zu projizieren. (a) Gehirn, (b) graue Substanz, (c) Skalp und Gehirn. Die Koordinaten beziehen sich auf das rechtshändige Koordinatensystem (positive x-Achse auf der rechten Seite des Gehirns, positive y-Achse im anterioren Teil des Gehirns, positive z-Achse in Richtung des superioren Teils des Gehirns).

Die Interpretation der Ergebnisse ergibt sich auch hier wieder aus einer Farbcodierung in dem entsprechend ausgewählten Bildmaterial. Im Folgenden sowie dem Ergebnisteil, unter 5.3 Analyse der EEG-Daten dieser Studie, wurden Schnittbilder des Gehirns in der Frontal-, sowie Horizontalebene gewählt. Die farbigen Markierungen innerhalb der grauen Substanz bezeichnen Areale mit neuronaler Aktivierung, deren Stromdichte gemessen und graphisch dargestellt wird. Die CSD (current source density) erreicht dabei die Farben blau (CSD=0) über grün bis rot (CSD=Maximum). Die über den Schnittbildern befindlichen Zahlen geben zudem Auskunft über die Ebene der Schnittbilder in Millimetern, entsprechend des Standard-Koordinatensystems nach Talairach. Dieses ist ein dreidimensionales Koordinatensystem des menschlichen Gehirns, im Sinne eines Atlas<sup>4</sup>. Der Atlas kann auf Datensätze von Patienten oder Probanden abgebildet werden und dient so der räumlichen Repräsentation wesentlicher Strukturen und der Abbildung individueller Hirngeometrien. Zur Orientierung wurden einige Fixpunkte festgelegt: Commissura anterior und Commissura posterior liegen exakt auf einer horizontalen Linie. Betrachtet man diese Verbindung in ihrer Vertikalebene, ergibt sich die Mitte der Sagittalebene. Die y-Achse ist definiert als anterior und posterior der Commissuren, die x-Achse versteht sich als rechts und links davon. Betrachtet man die inferior-superior Ausrichtung, befindet man sich auf der z-Achse des Koordinatensystems nach Talairach. In Abbildung 20 wird z.B. ein Koronarschnitt der grauen Substanz abgebildet. Die Zahl über den Schnittbildern gibt in Millimetern an, wieweit sich die dargestellte Ebene beziehungsweise auf die Commissura anterior (definierter Nullpunkt) in anteriore (positives Vorzeichen) bzw. in diesem Fall posteriore (negatives Vorzeichen) Richtung befindet.

**Abbildung 9** Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität mit Cartool. Das Ergebnis der inverse solution zeigt Schnittbilder eines menschlichen Gehirns. Farbcodiert werden Areale neuronaler Aktivierung infolge eines applizierten Reizes dargestellt (Brunet et al. 2011).

#### **4.9 statistische Auswertung**

Die Analyse der psychophysischen Daten und deren anschließende Darstellung erfolgte mittels SPSS® (Statistical Packages for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA) Version 17.0 sowie Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, USA). In den Grafiken wurden Ergebnisse der deskriptiven Statistik dargestellt.

Zur Überprüfung der Homogenität der vordefinierten Altersklassen wurden Chi-Quadrat-Tests verwendet. Als Maß für den statistisch signifikanten Zusammenhang der Messwerte (Riech- und Schmeckvermögen/Alter) diente der Korrelationskoeffizient nach Pearson.

Um zu untersuchen, wie sich die Erwartungswerte (TDI-Wert für das Riechvermögen und Testergebnisse der Schmeckstreifentests für das Schmeckvermögen) in den verschiedenen Gruppen (Altersklassen) unterscheiden bzw. um zu ermitteln, ob es signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen gibt, wurden multifaktorielle Varianzanalysen (MANOVA) durchgeführt.

Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 0,05 festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Probandenkollektiv

Insgesamt nahmen 96 Studienteilnehmer an den Untersuchungen teil. Für die Analyse der psychophysischen Daten mussten keine Probanden ausgeschlossen werden.

Das gesamte Probandenkollektiv wurde in 4 Altersgruppen eingeteilt:

- a) 18-30 Jahre
- b) 31-44 Jahre
- c) 45-60 Jahre
- d) 61-70 Jahre

Die deskriptive Statistik der vier Altersgruppen wird in Tabelle 2 Altersverteilung der Probanden und Tabelle 3 Anzahl und Altersverteilung der Probanden sowie Abbildung 10 beschrieben.

**Tabelle 2** Altersverteilung der Probanden

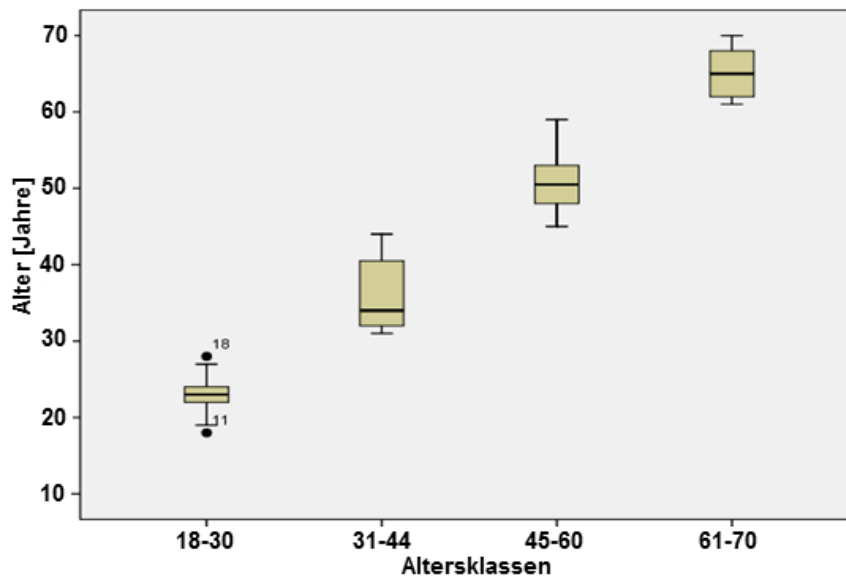
Altersklasse	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
a (18-30)	30	18	28	23,10	2,123
b (31-44)	24	31	44	35,67	4,430
c (45-60)	22	45	59	51,14	4,335
d (61-70)	20	61	70	65,20	3,254

**Tabelle 3** Anzahl und Altersverteilung der Probanden

Altersklasse	f	m	gesamt
<b>a (18-30)</b>			
n	15	15	30
% innerhalb der Gruppe	50%	50%	100%
% des Geschlechts	28,8%	34,1%	31,3%
% der Gesamtheit der Probanden	15,6%	15,6%	31,3%
<b>b (31-44)</b>			
n	10	14	24
% innerhalb der Gruppe	41,7%	58,3%	100,0%
% des Geschlechts	19,2%	31,8%	25,0%
% der Gesamtheit der Probanden	10,4%	14,6%	25,0%
<b>c (45-60)</b>			
Menge	16	6	22
% innerhalb der Gruppe	72,7%	27,3%	100,0%
% des Geschlechts	30,8%	13,6%	22,9%
% der Gesamtheit der Probanden	16,7%	6,3%	22,9%
<b>d (61-70)</b>			
n	11	9	20
% innerhalb der Gruppe	55,0%	45,0%	100,0%

% des Geschlechts	21,2%	20,5%	20,8%
% der Gesamtheit der Probanden	11,5%	9,4%	20,8%
<b>Gesamt</b>			
n	52	44	96
% innerhalb der Gruppe	54,2%	45,8%	100,0%
% des Geschlechts	100,0%	100,0%	100,0%
% der Gesamtheit der Probanden	54,2%	45,8%	100,0%

Die Homogenität der Geschlechterverteilung innerhalb der Altersklassen wurde mittels Chi-Quadrat-Test geprüft. Bei  $p=0,19$  ( $p>0,05$ ) kann davon ausgegangen werden, dass die Geschlechter innerhalb der Gruppen homogen verteilt sind.



**Abbildung 10** Verteilung des Alters innerhalb der Altersklassen.

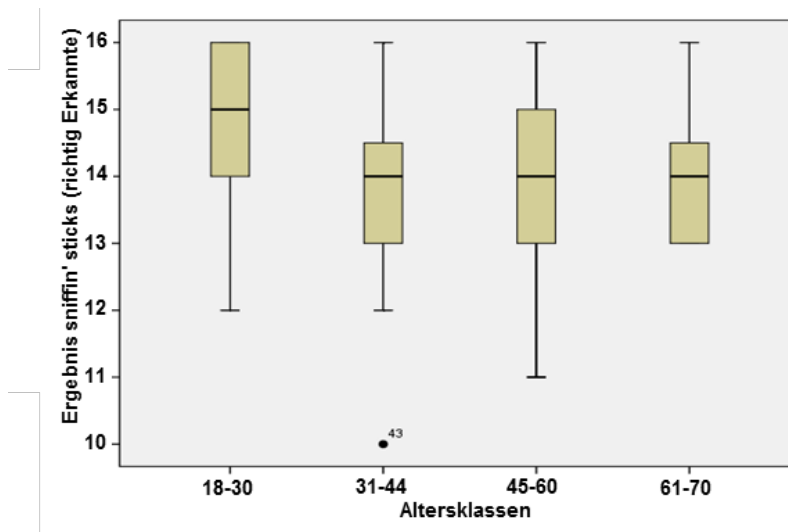
## 5.2 Altersabhängigkeit des Riech- und Schmeckvermögens in den Vortests mittels sniffin' sticks und Schmeckstreifen

In der Ermittlung des Riech- und Schmeckvermögens, während der Eignungstestung zur Studienteilnahme, wiesen alle teilnehmenden Probanden Normwerte auf. Im Mittel erreichten jüngere Probanden sowohl im Riech-, als auch im Schmecktest, höhere Werte, als ältere Teilnehmer.

### Sniffin' sticks

**Tabelle 4** Altersabhängigkeit des Riechvermögens (sniffin' sticks; korrekt erkannte Düfte)

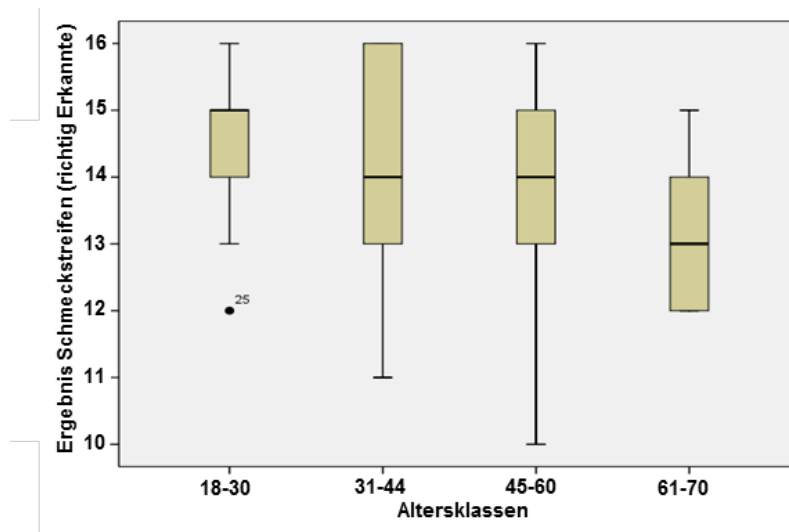
Altersklasse	Mittelwert	Minimum	Maximum	SD
<b>18-30</b>	14,8	12	16	1,338
<b>31-44</b>	13,8	10	16	1,260
<b>45-60</b>	14,1	11	16	1,342
<b>61-70</b>	14,0	13	16	1,076



**Abbildung 11** Altersabhängigkeit des Riechvermögens (sniffin' sticks)

Schmeckstreifen**Tabelle 5** Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens (Schmeckstreifen; korrekt Erkannte)

Altersklasse	Mittelwert	Minimum	Maximum	SD
<b>18-30</b>	14,5	12	16	0,937
<b>31-44</b>	14,1	11	16	1,624
<b>45-60</b>	13,9	10	16	1,509
<b>61-70</b>	13,3	12	15	1,070

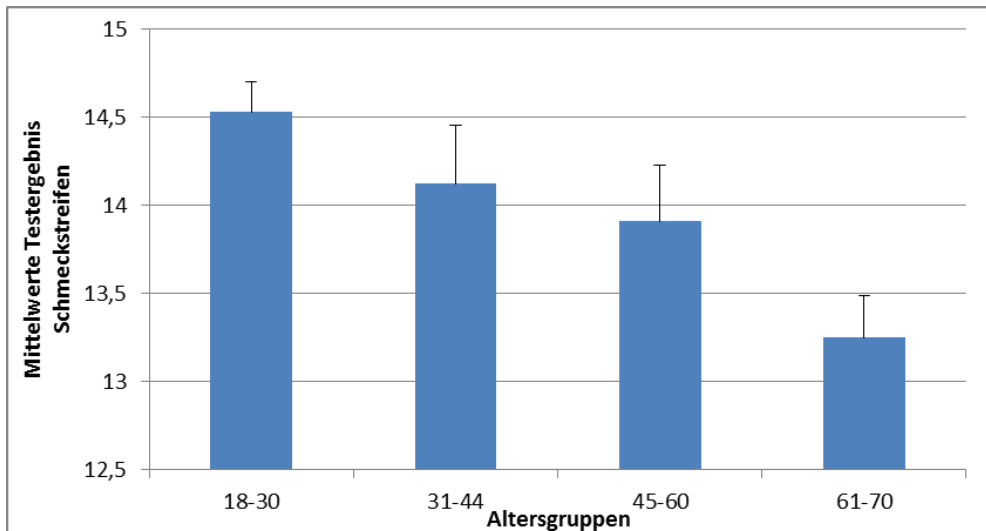
**Abbildung 12** Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens (Schmeckstreifen)

Um eine statistisch signifikante Korrelation des Schmeck- bzw. Riechvermögens gegen das Alter zu ermitteln, wurde die Pearson-Korrelation genutzt. Bei dieser zeigt sich eine statistisch signifikante Korrelation ( $r_{96} = -0,20$ ,  $p = 0,047$ ).

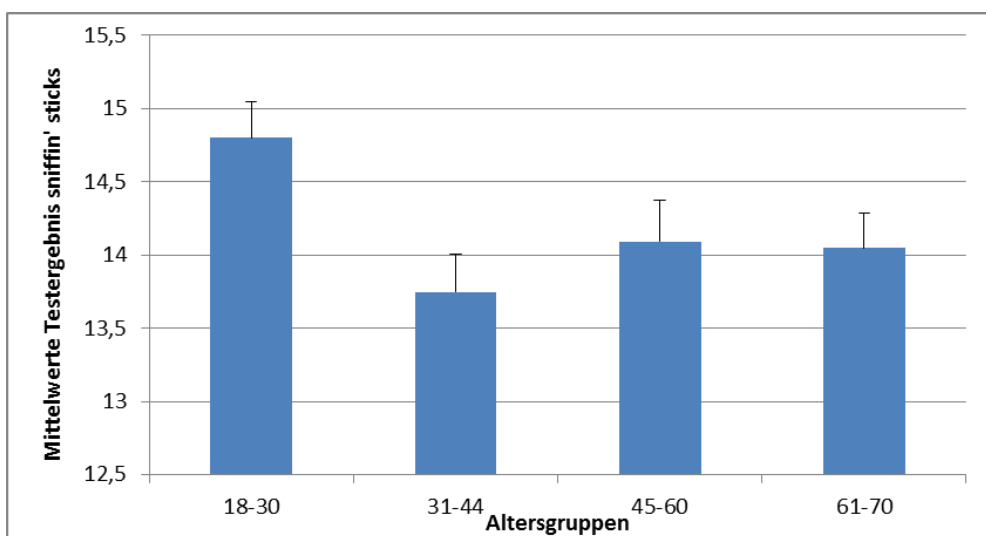
Eine statistisch signifikante Korrelation konnte ebenfalls zwischen den Schmeckstreifen und dem Alter gezeigt werden ( $r_{96} = -0,32$ ,  $p = 0,00$ ). Die negative Korrelation bestätigt die Vermutung, dass das Schmeckvermögen mit Zunahme des Alters abnimmt.

Weiterhin wurde ein MANOVA one way test durchgeführt, um die Altersabhängigkeit der Riech- und Schmeckfunktion zu untersuchen. Als abhängige Variablen wurden der TDI-Wert für das Riechvermögen sowie die Ergebnisse der Schmeckstreifentest für das Schmeckvermögen verwendet. Die Altersklassen stellen die unabhängige Variable dar. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den vier Altersklassen: ( $F(6,182) = 3,49$ ,  $p = 0,003$ ). Werden die Resultate der abhängigen Variablen

separat betrachtet, erreichen beide einen statistisch signifikanten Unterschied auf einem alpha level (Bonferroni Korrektur) von 0,01 für die Schmeckstreifen und 0,013 für die sniffin' sticks ( $F(1,92)=4,00$ ;  $F(1,92)=3,79$ ). Ein Betrachten der Mittelwerte lässt, wie durch den Korrelationstest vermutet, den Schluss zu, dass ältere Menschen geringere Werte in Riech- und Schmecktests erreichen.



**Abbildung 13** Abnahme der Mittelwerte (Testergebnis Schmeckstreifen-Test) mit zunehmendem Alter. Darstellung mit SEM.



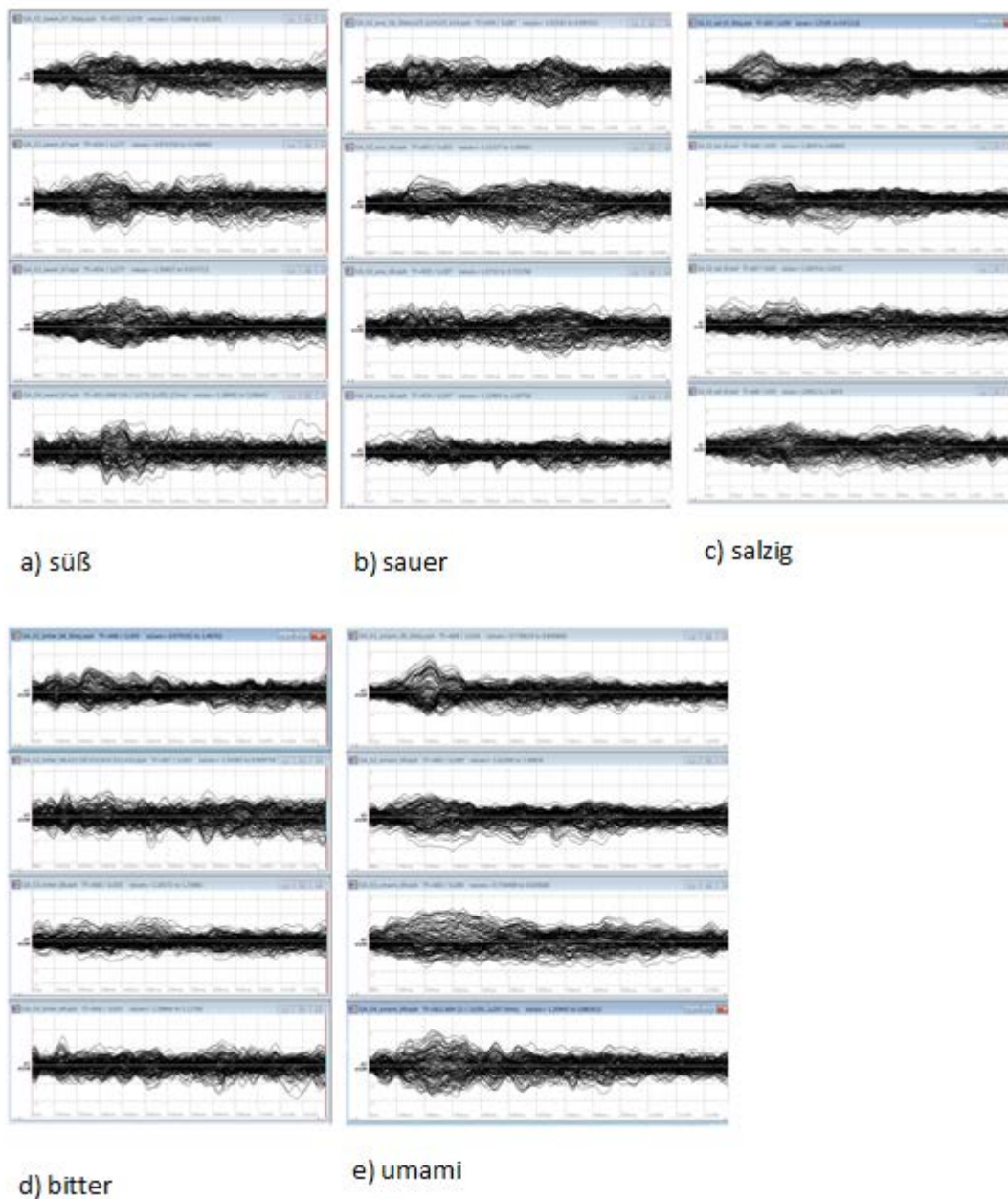
**Abbildung 14** Abnahme der Mittelwerte (Testergebnis sniffin' sticks) mit dem Alter. Darstellung mit SEM.



### 5.3 Analyse der EEG-Daten

#### Das Gesamtmittel (Grand-Average)

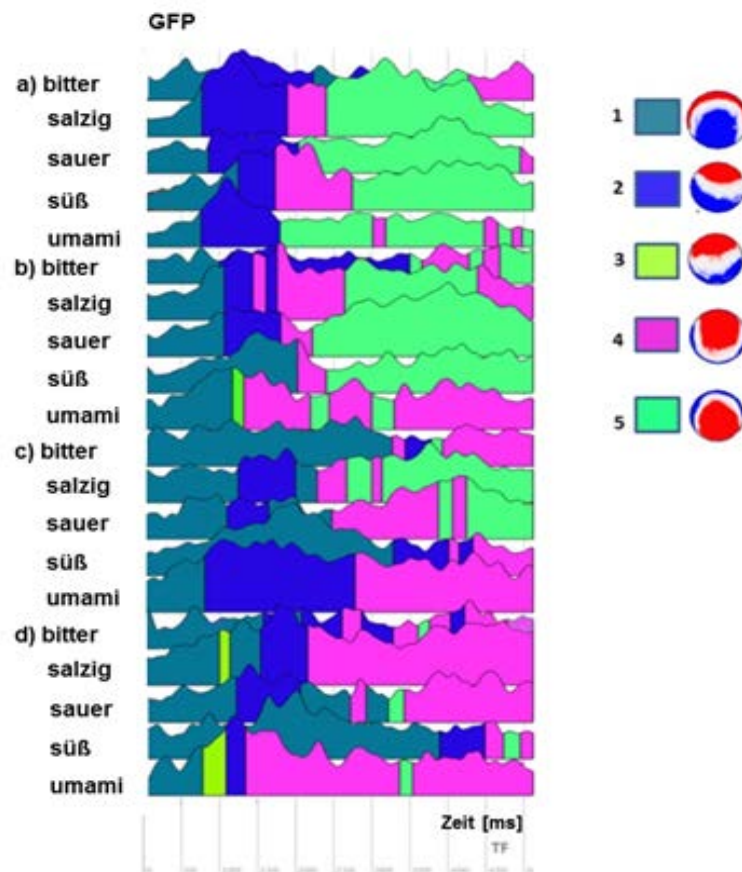
Für jede Altersgruppe und jede Schmeckkondition wurden Gesamtmittelwerte errechnet, welche als Mittelwert der neuronalen Aktivität der Gruppe zu verstehen sind.



**Abbildung 15** Butterfly plots. Darstellung der Gesamtmittelwerte für jede Gruppe (in den Abbildungen a) bis e) jeweils aufsteigend von der jüngsten Altersgruppe [G1, oben] bis zur ältesten Altersgruppe [G4, unten]) und jede Kondition (Schmeckrichtungen s. Beschriftung).

### Clustering

Entsprechend des unter *Material und Methoden (4.8 Analyse der EEGs)* beschriebenen Analysevorganges erfolgte die Auswertung der aufgezeichneten Daten. Es resultierten fünf verschiedene *maps*, von denen anzunehmen ist, dass sie den Schmeckvorgang im Gehirn am besten reproduzieren (Abbildung 16).



**Abbildung 16** microstate segmentation für die vier Altersgruppen (a=18-30 Jahre, b=31-44 Jahre, c=45-60 Jahre, d=61-70 Jahre) mit den 5 Konditionen (bitter, salzig, sauer, süß, umami) (links), sowie Abbildung der fünf beständigen maps (rechts oben). Analyse der microstate segmentation s. Abbildung 21.

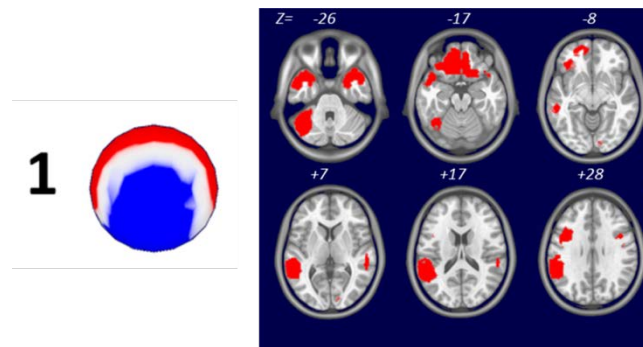
Die im Folgenden dargestellten Abbildungen zeigen auf der linken Seite die erstellten *cluster maps*. Dabei wird die Schädeloberfläche von oben betrachtet. Der obere Rand der Abbildung ist nasalwärts, der untere Abschnitt demnach nach occipital gerichtet. Links im Bild bleibt bei der Betrachtung links auf der Schädeloberfläche und die rechte Seite entspricht auch in der Realität rechts. Durch das EEG werden die Daten der 128 Elektroden auf der Schädeloberfläche der Probanden registriert und mit Hilfe dieser die neuronale Aktivität

gemessen. Diese Daten werden der Cartool Software zur Verfügung gestellt. Durch die verabreichten Stimuli entstehen in Form ereigniskorrelierter Potentiale Potentialänderungen im Gehirn, welche sich in einer Größenordnung von Millionstel Volt bewegen. Um diese Veränderungen nun graphisch darzustellen, werden durch Cartool die sog. *cluster maps* gebildet, die den gesamten Datensatz repräsentieren. Hirnareale gleicher neuronaler Aktivität werden farblich identisch dargestellt, sodass zu verfolgen ist, in welcher Region des Gehirns eine Aktivierung bzw. Potentialänderung stattfindet. Cartool bedient sich eines Farbspektrums, welches sich entsprechend der Voltzahl von einem negativen Bereich (blau dargestellt) über 0 (weiß) bis in den positiven Mikrovoltbereich (in der Abbildung rot) bewegt.

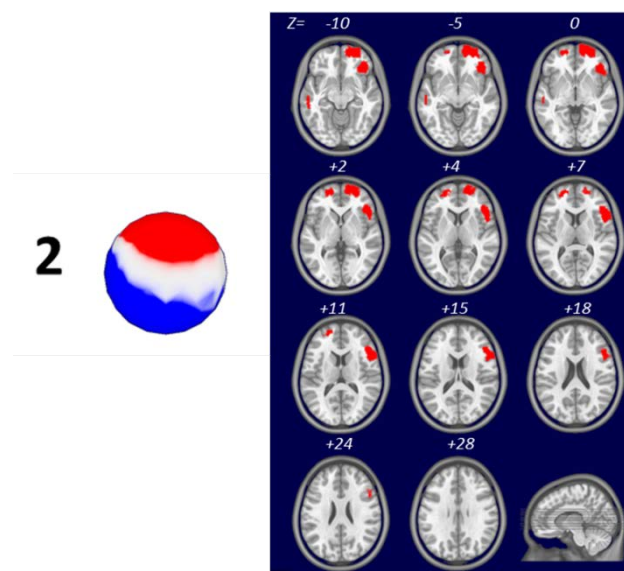
#### Source localisation

Führt man diese *cluster maps* anschließend der *inverse solution* (hier: LAURA) zu, ist es möglich, die Quellen der auf der Oberfläche sichtbaren neuronalen Aktivität zu bestimmen (für nähere Informationen s. 4.8.4 Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität (source localisation)). Die Resultate dieser Berechnungen können je nach Belieben des Anwenders auf gewünschten Hirnschnitten oder der Gehirnoberfläche dargestellt werden. In den Abbildungen auf der rechten Seite ersichtlich sind horizontale Schnittbilder des menschlichen Gehirns, mit Ausnahme von Koronarschnitten in *map 5*. Die Betrachtung der Horizontalschnitte erfolgt von oben, sodass auch hier der obere Bildrand nach nasal, der untere Bildrand nach occipital ausgerichtet ist. Abschnitte auf der rechten Seite des Hirnschnittes bilden auch den rechten Teil des Gehirns ab und umgekehrt. Für *map 5* (Koronarschnitt) gilt eine Betrachtung des Hirnschnittes von hinten. Alle Lagebeziehungen der Abbildung (rechts, links, oben und unten) entsprechen denen der Realität, es erfolgte keine seitenverkehrte Darstellung. Die neuronale Aktivität wird an dieser Stelle nicht mehr, wie bei den *cluster maps*, in Mikrovolt dargestellt. Hingegen ist die aktuelle Stromdichte erkenntlich gemacht, d.h. der dort fließende Strom pro Querschnittsfläche, als CSD (current source density) farbcodiert dargestellt. Das Spektrum reicht von blau (CSD=0) über grün bis rot (CSD=Maximum). Die über den Schnittbildern befindlichen Zahlen geben Auskunft über die Schnittebene in Millimetern, bezugnehmend auf die Commissura anterior/posterior-Ebene entsprechend des Koordinatensystems nach Talairach (für Details s. 4.8.4 Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität (source localisation)).

Mit der Gesamtheit dieser Informationen ist man nun in der Lage, die Gehirnaktivität infolge evozierter Potentiale hinsichtlich ihrer Quelle zu lokalisieren. Konkret lassen sich folgende Hirnareale während der Stimulation der Schmeckrezeptoren darstellen:



**Abbildung 17** map 1: Axialschnitt des menschlichen Gehirns. Areale mit neuronaler Aktivierung: Orbitofrontaler/präfrontaler Kortex sinister et dexter, Gyrus frontalis inferior (links) (Insula und Operculum), Cerebellum (linksseitig) und Gyrus temporalis superior (linksseitig).



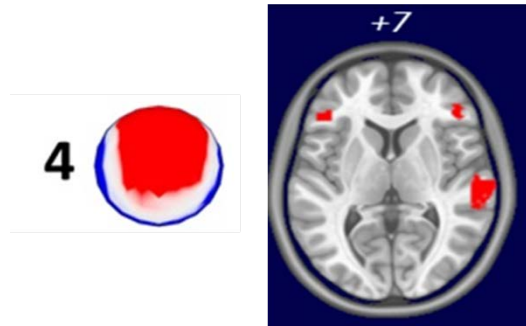
**Abbildung 18** map 2: Axialschnitt des menschlichen Gehirns. Areale mit neuronaler Aktivierung: präfrontaler Kortex sinister et dexter, Insula (rechts), frontales Operculum, Gyrus frontalis inferior (rechtsseitig).

Map 1 und 2 beschreiben neuronale Aktivität in den o.g. Hirnarealen, darunter dem primären und sekundären gustatorischen Kortex. Dieser befindet sich im anterioren und mittleren Teil der Insularegion sowie in dem darüber liegenden frontalen Operculum (primärer gustatorischer Kortex). Der sekundäre gustatorische Kortex ist im präfrontalen Kortex lokalisiert (Small et al. 1997; Schoenfeld et al. 2004; Hummel et al. 2007a).

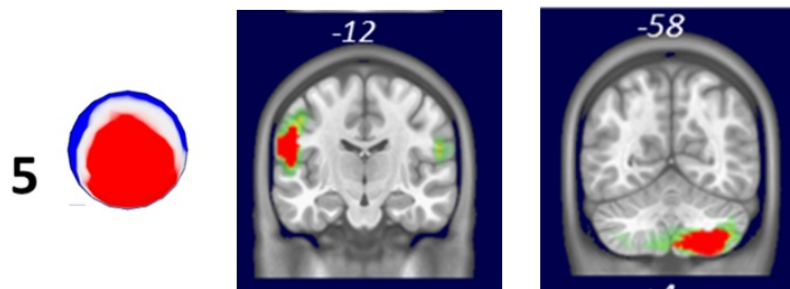
Map 3 kann als Übergangszone betrachtet werden, die in 62 % der neuronalen Aktivität mit map 2 übereinstimmt. In Abbildung 21 kann man die deutliche Überlappung der Areale in

map 2 und 3 gut erkennen. Auf eine separate Darstellung von *map 3* wird an dieser Stelle folglich verzichtet.

Weitere beständige maps, die sich im Verlauf der Analyse ergaben, waren *map 4* und *map 5*.



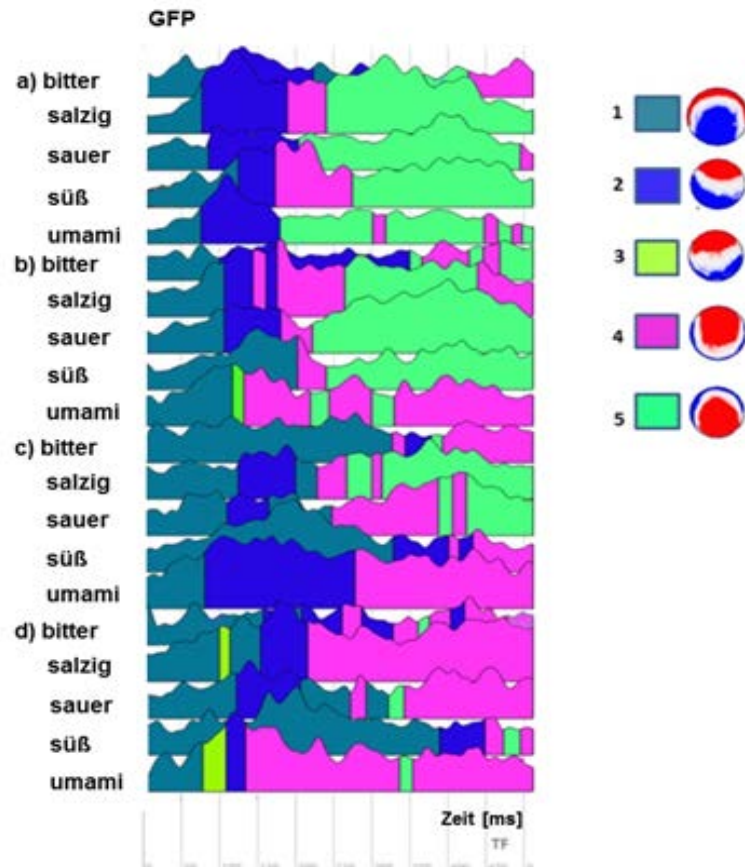
**Abbildung 19** *map 4: Axialschnitt des menschlichen Gehirns. Areale mit neuronaler Aktivierung: Gyrus frontalis inferior (links und rechts), Gyrus temporalis superior (rechts).*



**Abbildung 20** *map 5: Koronarschnitt des menschlichen Gehirns. Areale mit neuronaler Aktivierung: links parietales und frontales Operculum, Cerebellum (rechts).*

Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist es nun wichtig, die *microstate segmentation* (Abbildung 21) näher zu betrachten. Die Lokalisation der Quellen neuronaler Aktivität scheint mit den *maps* 1 bis 5 erschlossen. Wie verhalten sich diese Areale nun aber in Abhängigkeit des Stimulus und Alters? Im Folgenden dargestellt finden sich alle Schmeckbedingungen (bitter, salzig, sauer, süß, umami) für die vier festgelegten Altersklassen a bis d. Diese sind am linken Bildrand aufsteigend benannt. Unter den Kurven der GFP kennzeichnen verschiedene Farben die verschiedenen Segmente (für nähere Informationen s. 4.8.2 Microstate segmentation) über den Verlauf der Zeit. Die *cluster maps* 1 bis 5 dieser Segmente sind auf der rechten Seite der Abbildung farblich entsprechend dargestellt. Anhand dieser Markierung ist die Abfolge der Aktivierung der verschiedenen Hirnareale nach Stimulation der Schmeckrezeptoren nachzuvollziehen.



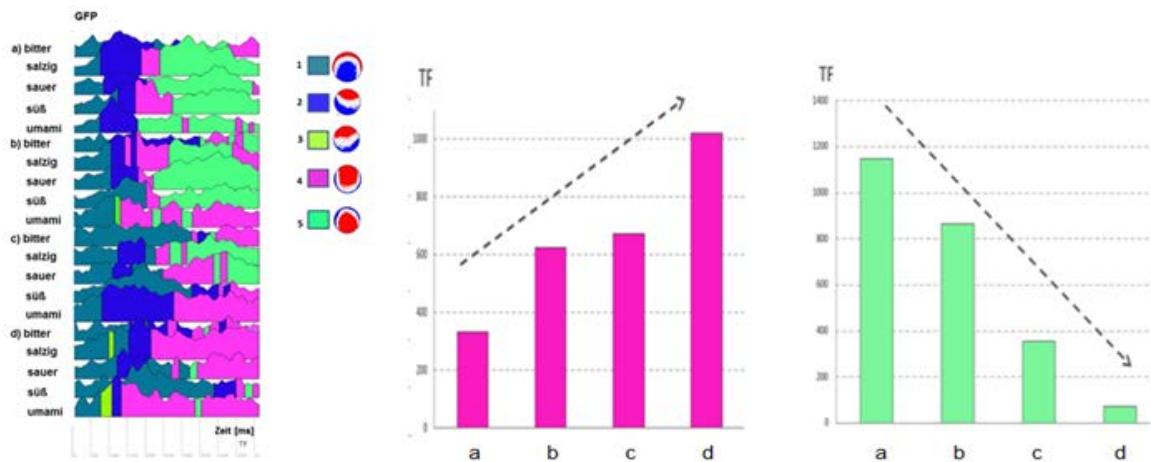


**Abbildung 21** microstate segmentation für die vier Altersgruppen (a=18-30 Jahre, b=31-44 Jahre, c=45-60 Jahre, d=61-70 Jahre) mit den 5 Konditionen (bitter, salzig, sauer, süß, umami) (links), sowie Abbildung der fünf beständigen maps (rechts oben).

Unabhängig von der Schmeckrichtung und der Altersklasse beginnt der gustatorische Verarbeitungsprozess mit *map 1* und ist stets gefolgt von *map 2*, mit einigen Ausnahmen für die Bedingungen süß und umami in Altersklasse b und bitter in Altersgruppe a und c. Im weiteren Verlauf wird der Schmeckvorgang durch *map 4* beschrieben, einige kurze Episoden von *map 3* werden vorher in Altersklasse b und d für salzig bzw. umami ersichtlich. Interessant ist nun zu beobachten, dass die Anwesenheit von *map 4* länger wird, je älter die Probanden sind. Die Farbmarkierung in der *microstate segmentation* für dieses Areal nimmt mit dem Alter deutlich zu. Schließlich wird der gustatorische Prozess in Altersgruppe a und b durch *map 5* abgeschlossen, während dieses Hirnareal in Altersklasse c kürzer und bei den ältesten Teilnehmern überhaupt nicht mehr aktiviert wird.

Wirft man zudem einen Blick auf die fünf verschiedenen Schmeckkonditionen, kann man erkennen, dass diese bis zu einem Zeitfenster von 370 ms durch *map 1* und 2 beschrieben

werden, *map* 4 und 5 sich anschließend im gustatorischen Verarbeitungsprozess abhängig vom Stimulus abwechseln.



**Abbildung 22** Graphische Darstellung der Verteilung von *map* 4 und *map* 5 entsprechend der Altersklassen (a=18-30 Jahre, b=31-44 Jahre, c=45-60 Jahre, d=61-70 Jahre)

Die für die in dieser Arbeit vorliegende Fragestellung bedeutsamen Regionen für jede Schmeckrichtung sind demnach einerseits *map* 4, deren Präsenz im Alter deutlich zunimmt, andererseits *map* 5, die in der betagtesten Probandengruppe keine Relevanz mehr zu haben scheint.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse im Rahmen der Vortests eine Abnahme des Riech- und Schmeckvermögens mit zunehmendem Alter bestätigen konnten. Der Schmeckvorgang konnte innerhalb der anatomischen Strukturen des zentralen Nervensystems nachvollzogen werden, wobei die Verarbeitung des Schmeckens, unabhängig vom Alter, anfangs im anterioren und mittleren Teil der Insularegion sowie in dem darüber liegenden Operculum (primärer gustatorischer Kortex; *map* 1 und 2) beschrieben werden. Es folgt die weitere Erregung des linken und rechten Gyrus frontalis inferior sowie des rechten Gyrus temporalis superior (*map* 4). Die Aktivierung dieser Hirnareale (*map* 4) nimmt mit zunehmendem Alter an Dauer zu, der Schmeckvorgang bei Probanden der Altersklassen a und b wird anschließend jedoch im links parietalen und frontalen Operculum und rechtem Cerebellum (*map* 5) beendet. Die Präsenz dieser *map* 5 ist bei älteren Probanden sehr kurz, bis sie in Altersgruppe d interessanterweise überhaupt nicht mehr aktiviert wird.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Einfluss des Alters auf das Riech- und Schmeckvermögen**

Schon seit Jahrzehnten wird der Einfluss des Alterns auf die chemosensorischen Funktionen in zahlreichen Studien untersucht. Bereits im mittleren Alter findet sich eine Abnahme des Riechvermögens, mit nachweislich längerer Latenz und niedrigerer Amplitude im olfaktorisch ereigniskorrelierten Potential bei Älteren im Vergleich zu Jüngeren (Murphy et al. 1998). Einige weitere Studien belegen die Abnahme des Riechens und Schmeckens mit dem Alter (Murphy and Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014), welches mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte. Stevens führte in einer Versuchsreihe Testungen durch, in dem er einen Geschmack durch einen anderen maskierte, um Grenzwerte für die Detektion des Grundgeschmacks zu ermitteln. Je mehr von der maskierenden Substanz hinzugefügt wurde, desto schwieriger war es folglich, den Grundgeschmack zu erkennen. Stevens betrachtete dieses Phänomen hinsichtlich einer Veränderung mit dem Alter und fand heraus, dass der Schwellenwert der älteren Gruppe für das Erkennen des Geschmacks stets 2-7mal höher lag, als der, der jüngeren Probanden. Weiterhin zeigte sich, dass der Grenzwert der Testung in jedem Alter (18-29 vs. 66-90 Jahre) mit zunehmender Maskierung des Grundgeschmacks parallel anstieg (Stevens 1996).

Mit dem Ziel herauszufinden, ob das Schmeckvermögen im Alter hinsichtlich der Schmeckrichtungen auf verschiedenen Zungenabschnitten gleichartig abnimmt oder der Fokus hierbei auf bestimmten Schmeckrichtungen liegt, führten Nordin et al. Tests mit Schmeckstreifen durch, die den Probanden süß, sauer, salzig und bitter auf die Zungenspitze, die Mitte der Zunge und die Mitte im hinteren Zungenabschnitt präsentierten. Sie kamen zu dem Resultat, dass vor allem das Schmecken von sauer und bitter im Alter nachlässt, weniger das Empfinden für süß und salzig (Nordin et al. 2007).

Nicht nur Schmeckrichtungen, auch Männer und Frauen sind differenziert zu betrachten. Das Schmeckvermögen lässt bei Männern demnach deutlicher nach, als es das bei Frauen tut (Fikentscher et al. 1977). Befragt man die Menschen allerdings hinsichtlich ihres Riech- und Schmeckvermögens, bezeichnet sich ein Großteil der Teilnehmer auch im fortgeschrittenen Alter als normosmisch bzw. normogustisch. Dass sich die Einschätzung ihrer Sinnesleistung im Laufe des Lebens nicht ändert, wenn sie nicht gravierend in Erscheinung tritt, liegt daran, dass sich die Probanden immer in der gleichen Bezugsgruppe, einer sog. „Peergroup“ vergleichen, und demnach subjektiv normal empfinden, so Shu et al. (Shu et al. 2009). Auch



in unserer Studie konnten wir dieses Verhalten beim Ausfüllen der Anamnesebögen beobachten.

Dieses bekannte Phänomen der altersabhängigen Reduktion des Riech- und Schmeckvermögens bleibt oft unentdeckt, aber nicht immer folgenlos. Sowohl das Alter, als auch das Geschlecht bestimmen die Wahl des Essens: Frauen ernähren sich im Allgemeinen gesünder, leben bewusster auch hinsichtlich ihres Körpergewichts. Mit nachlassender Sinnesleistung wird dieses Bewusstsein sowohl bei Männern, als auch bei Frauen, zunehmend abgelegt. Die Nahrungsmittel wirken weniger schmackhaft, was eine vernachlässigte Wahl des Essens mit einseitiger Ernährung (Westenhoefer 2005) und schlechtem Gesundheitszustand nach sich ziehen kann.

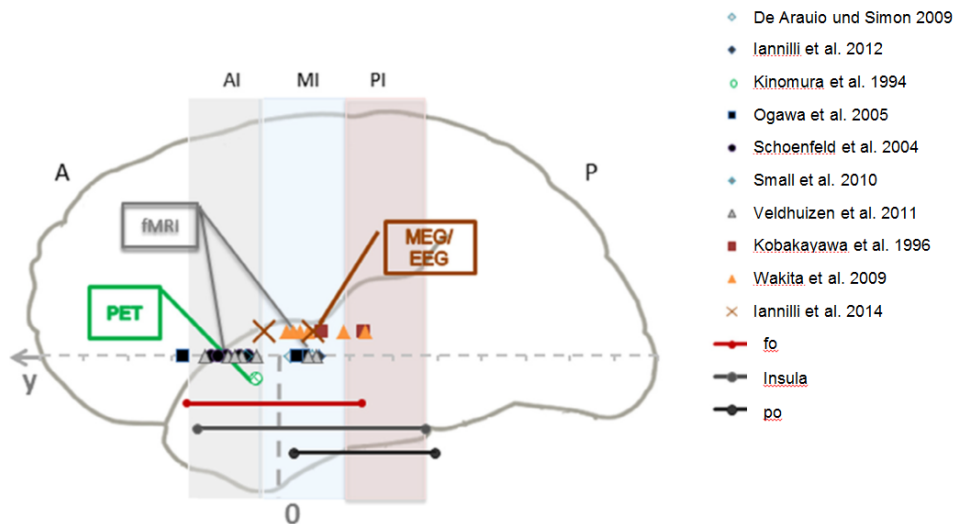
Die Bestätigung der Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens in der vorliegenden Untersuchung dient als verlässliche Grundlage für die weiteren Studien, in denen neuronale Unterschiede des Schmeckvorgangs in definierten Altersklassen untersucht werden sollen.

## 6.2 Topographie der Schmeckverarbeitung im Gehirn

Die Komplexität der gustatorischen Verarbeitung wird durch ein gigantisches Netzwerk von Schmeckbahnen im Gehirn realisiert, welches eine detaillierte Analyse der Feinheiten eines Sinneseindrucks realisiert. Dieses System ist bis dato noch immer Gegenstand zahlreicher Diskussionen und nicht in allen Einzelheiten geklärt. Ein Teilziel dieser Studie war es, dies im Detail zu untersuchen. Seit mehreren Jahrzehnten wird die Schmeckverarbeitung im Gehirn mittels unterschiedlicher Techniken wie MRT-, CT-, PET- und gERP- Studien erforscht, ohne bisher einen einstimmigen Konsens gefunden zu haben. 12 Patienten mit Blutungen im Pons wurden 1983 beispielsweise untersucht, welche ipsilaterale Schmeckstörungen auf der Zunge aufwiesen. In diesem Zusammenhang konnte einerseits gezeigt werden, dass die Verarbeitung des Schmeckens über den Nucleus tractus solitarius ohne zu kreuzen in das ipsilaterale Tegmentum zieht, gleichzeitig wurde damit auch die Pons als Areal der gustatorischen Schmeckbahn thematisiert (Goto et al. 1983). Hummel et al. publizierten Jahre später eine MRT-Studie, in der 12 gesunden Probanden und 8 Patienten mit Hypo- und Ageusie die vier Geschmacksrichtungen süß, sauer, salzig und bitter auf die Zunge appliziert wurden. Sowohl die Insula, als auch der orbitofrontale Kortex wurden bei allen Teilnehmern aktiviert, interessanterweise verstärkt bei den Patienten mit Schmeckstörung. Kann man demnach von einem neuronalen Recruitment infolge der funktionalen Einschränkung ausgehen (Hummel et al. 2007a)? Eine gERP Studie aus dem Jahr 2011 stellte signifikante Unterschiede in der Verarbeitung der Schmeckrichtungen umami und salzig heraus und zeigte gleichzeitig eine scheinbare Dominanz der rechten Hemisphäre für die Verarbeitung der beiden Geschmäcker (Singh et al. 2011). Noch im gleichen Jahr veröffentlichten Chen et al. eine Studie, in der deutlich wurde, dass jede Schmeckrichtung in der Insula von Säugetieren durch eine spezifische Gruppe von Neuronen kodiert wird. Dass dies auch für das menschliche Gehirn zutrifft, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht bestätigt werden (Chen et al. 2011). Studien an Menschen, die auf Läsionen des Gehirns beruhen, berichten von Schmeckstörungen bei Verletzung von acht Regionen, die demnach mit Schmeckstörungen in Verbindung zu stehen scheinen: dies sind Medulla, Pons, das Mittelhirn, Thalamus, Capsula interna, Putamen, Corona radiata und Kortex (Onoda et al. 2012a). Im Rahmen von Neuroimaging Studien geraten vor allem die Insula und das darüber liegende Operculum immer wieder in den Fokus, als primärer gustatorischer Kortex anerkannt zu werden (Small et al. 1999; Faurion et al. 2005). Auch in Metaanalysen konnte keine klare Aussage bezüglich der Lokalisation des primären gustatorischen Kortex getroffen werden (Small 2010; Veldhuizen et al. 2011). Veldhuizen et al. verglichen 15 Studien, die sich mit der Lokalisation des Schmeckens beschäftigten. Signifikante kortikale Aktivierungen wurden in folgenden Gebieten gefunden: bilaterale anteriore Inselregion und darüber

liegendes frontales Operculum, bilaterale Inselregion dorsal mittig und darüber liegendes Operculum, bilaterale posteriore Inselregion/parietales Operculum/Gyrus postcentralis, linker lateraler orbitofrontaler Kortex (OFK), rechter medialer OFK, prägenualer anteriorer Kortex cinguli (pregenual anterior cingulate cortex, prACC) sowie rechter mediodorsaler Thalamus.

Worin aber liegen die Ursachen für diese jahrelangen Debatten um die Lokalisation des primären gustatorischen Kortex? Mehrfach wurde beschrieben, dass die Applikation der Stimuli sehr präzise erfolgen muss, um eine rein gustatorische Antwort der neuronalen Aktivität zu erhalten. Dies erschwert es, konkrete Aussagen zu dieser komplexen Verarbeitung zu treffen. Zudem ist die Insula keine homogene Struktur in der grauen Masse, viel mehr besteht sie aus einem anterioren agranulären Teil, einem posterior gelegenen granulären Abschnitt und einer Übergangszone, welche als dysgranulär beschrieben wird. So vielschichtig wie ihr Aufbau sind auch die Funktionen, die der Hirnregion zugeschrieben werden. Dazu gehören Empathie, Schmerzempfinden, Bewusstsein von Körperbewegungen, thermisches Empfinden, olfaktorische Wahrnehmung und ein Großteil des Schmeckempfindens. Eine Studie von Iannilli et al. fasst die bisherigen Resultate aktueller Forschung in einer graphischen Übersicht zusammen und zeigt damit die Varianz der bisherigen Ergebnisse sehr deutlich auf (Abbildung 23). Vor allem MRT- und PET-Studien beschreiben eine Aktivität der Neuronen im anterioren und mittleren Teil der Insula, während MEG/EEG-Studien den posterioren Teil der Insula als primären gustatorischen Kortex herausstellen (Kinomura et al. 1994; Kobakayakawa et al. 1996; Schoenfeld et al. 2004; Ogawa et al. 2005; de Araujo und Simon 2009; Wakita et al. 2009; Small 2010; Veldhuizen et al. 2011; Iannilli et al. 2012) .



**Abbildung 23** Resultate zehn verschiedener Neuroimaging-Studien zur Lokalisation des primären gustatorischen Kortex. Die Abbildung zeigt schematisch die graue Substanz des menschlichen Gehirns (links=anterior, rechts=posterior). Darstellung der Ausmaße des frontalen (fo) und parietalen Operculums (po) sowie der Insula (Insula) als schwarze, rote und graue Linie. Weitere Aufteilung der Insula in anterioren (AI), mittleren (MI) und posterioren (PI) Teil. MRT- und PET-Studien zeigen Aktivität in AI und MI, nicht in PI. MEG/EEG-Studien berichten von Aktivierung des PI (modifiziert nach Iannilli et al. 2014).

Mit dem Fokus, den primären gustatorischen Kortex zu benennen, wurden in dieser Studie (Iannilli et al. 2014) mittels 32-Kanal EEG und 256-Kanal MEG simultan gERPs und gERMFs aufgezeichnet, während die Probanden pulsatil mit süßen und salzigen Schmecklösungen stimuliert wurden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass sich über den Zeitverlauf eine Verlagerung der Aktivierung im Bereich der Insula abzeichnet: die Erregung wird anfangs im anterioren und mittleren Teil der Insula registriert, während sie nach etwa 300 ms im posterioren Teil der Insula lokalisiert werden kann (Iannilli et al. 2014).

Auch die in der vorliegenden Studie ermittelten Regionen beschreiben den primären gustatorischen Kortex im anterioren und mittleren Teil der Insularegion sowie in dem darüber liegenden Operculum. Weiterhin zeigten sich der linke und rechte Gyrus frontalis inferior und der Gyrus temporalis superior rechts als Regionen der Schmeckverarbeitung. Abgeschlossen wird der Schmeckvorgang im links parietalen und frontalen Operculum sowie dem rechten Cerebellum. Es finden sich folglich deutliche Parallelen zu vergangenen Studien; das Cerebellum als Ort der Schmeckverarbeitung wurde bisher allerdings noch nicht in dieser Form beschrieben. In sehr wenigen Studien wird bis dato Stellung zu einem Zusammenhang zwischen der Kleinhirnregion und dem Schmeckempfinden genommen, dennoch gibt es einige Anhalte, die die vorliegenden Ergebnisse untermauern.

### 6.2.1 Cerebellum mit Schlüsselfunktion?

Das Kleinhirn ist in seiner Funktion bisher vor allem bekannt für seinen Einfluss auf Planungsvorgänge, Koordination und die Feinabstimmung von Bewegungen. Als klassisches Symptom eines Ausfalls der Kleinhirnfunktion gilt die Ataxie. In den Fokus aktueller Forschung gerät mehr und mehr aber auch die Frage, ob das Cerebellum sowohl motorische, als auch nicht-motorische Funktionen vereint. So wird beispielsweise Autismus auch als Folge einer Funktionsstörung des Kleinhirns verstanden (Reeber et al. 2013). Auch kognitive (Sprache) und emotionale (Angst) Fähigkeiten sowie Schlaf stehen seit einigen Jahren im Fokus der Wissenschaftler (Schmahmann 2010; Bastian 2011; D'Angelo and Casali 2012) und hinterfragen damit die historische Meinung, das Kleinhirn reguliere vor allem flüssige Bewegungsabläufe. Mit nur fünf Arten verschiedener Neuronen bildet das Kleinhirn ein herausragendes Verbindungsglied zwischen Rückenmark und Hirnstamm, dem Hypothalamus und den Basalganglien, dessen Komplexität bis heute in Gänze noch nicht verstanden scheint. Über pontine Fasern erhält das Kleinhirn eine gewaltige Menge an Informationen, die über den Thalamus, Nucleus ruber, Formatio reticularis und Vestibulariskerne nicht nur zum motorischen Kortex, sondern auch zu anderen Hirnarealen weitergeleitet werden.

In der vorliegenden Studie konnte dargestellt werden, dass die Topographie der Schmeckverarbeitung anfangs unabhängig vom Alter in den Arealen der *maps* 1 bis 4 abzulaufen scheint, namentlich dem orbitofrontalen/präfrontalen Kortex, Gyrus frontalis inferior (links) (Insula und Operculum), dem Cerebellum (linksseitig) sowie dem Gyrus temporalis superior. Im weiteren Verlauf der neuronalen Verarbeitung konnte beobachtet werden, dass sich *map* 5 im Schmeckprozess bei Probanden der Altersklassen a und b verfolgen lässt (18-30 und 31-44 Jahre). Diese Region, welche das links parietale und frontale Operculum, aber auch das Cerebellum repräsentiert, wird bei älteren Probanden der Gruppe c (45-60 Jahre) nur noch kurz und bei den 61-70-jährigen Teilnehmern nicht mehr nachweisbar. Diese deutlich altersabhängige Präsenz des Cerebellums in der Schmeckverarbeitung und das Wissen um die Reduktion des Schmeckvermögens im Alter lassen vermuten, dass das Kleinhirn eine entscheidende Rolle im Schmeckvorgang spielt.

Relevant erscheinen in diesem Zusammenhang Untersuchungen von Lee et al. (Lee et al. 2005). 30 gesunde Teilnehmer mit einem Alter von über 50 Jahren wurden in die Studie eingeschlossen. Eine Abnahme des Punktwertes in einem durchgeführten Intelligenztest (Wechsler Adult Intelligence Scale) führten zu der Vermutung, es liege ein Verlust der grauen Masse im Frontallappen des Gehirns zugrunde. Ein MRT-Scan des Gehirns der

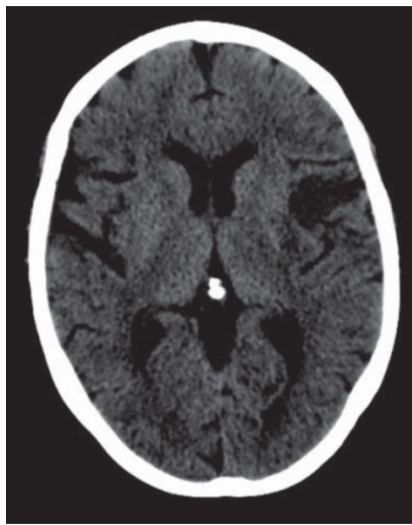
Teilnehmer zeigte jedoch eine starke Korrelation des Absinkens der Werte im Intelligenztest mit einer Dichteabnahme der grauen Substanz des rechten Neocerebellums ( $p < 0,005$ ); der Frontallappen war unbeteiligt. Diese Studie unterstützt folglich die Annahme einer Reduktion der Leistungsfähigkeit in Intelligenztests mit zunehmendem Alter der Probanden und setzt diese in Relation mit einer selektiven Atrophie des Gehirns im Alter, welche mit dem Kleinhirn assoziiert wurde. Es könnte daher angenommen werden, dass auch eine Abnahme der grauen Masse im Cerebellum unsere Daten beeinflusst.

Auch ein Fallbericht aus dem Jahr 1989 lässt aufhören, in dem ein 73 Jahre alter Mann das Essen seiner Frau plötzlich als zu süß und zu salzig empfand. Im Rahmen einer neurologischen Untersuchung wurden Schmecktestungen durchgeführt, die eine deutliche Reduktion der Schwellenwerte bestätigte; der Patient litt an einer bilateralen Hypergeusie. Weitere klinische Auffälligkeiten wie eine milde Dysphagie, Taubheit der Zehen und Finger aller Extremitäten, ferner eine mild ausgeprägte Hemiplegie rechts konnten diagnostiziert werden. Das CT des Schädels brachte schließlich einen den Hirnstamm verlagernden Tumor zum Vorschein, der den mittleren Kleinhirnschenkel und die rechte Kleinhirnhemisphäre involvierte. Eine Nebennierenrindeninsuffizienz sowie die Einnahme von Aspirin konnten als differentialdiagnostisch wichtige Ursachen der Hypergeusie ausgeschlossen werden. Die Diagnose eines Glioblastoma multiforme wurde gestellt, woraufhin man eine Strahlen- und Kortisontherapie einleitete, bis zu deren Beginn die Schmeckstörung des Patienten bestehen blieb. Die Anatomie der gustatorischen Schmeckbahn mit ihrem Verlauf zu den Nuclei tractus solitarii und einer Weiterleitung in das pontine Tegmentum ohne zu kreuzen, lässt angesichts der Tatsache, dass der Tumor keine weiteren Strukturen des Gehirns involvierte, nur den Schluss zu, dass die Hypergeusie aufgrund der Läsion im Bereich des Cerebellums auftrat (Noda et al. 1989). Den Daten liegt ein Einzelfall zugrunde, dessen detaillierte Analyse dennoch Anlass gibt, der Bandbreite der Funktionen des Cerebellums auch einen Anteil an der Verarbeitung des Schmeckens beizumessen.

### **6.2.2 Apoplektischer Insult und Schmeckstörung**

Oft werden physiologische Faktoren und Umweltbedingungen für chemosensorische Funktionsstörungen des Riechens und Schmeckens verantwortlich gemacht. Neben diesen augenscheinlich am häufigsten assoziierten Ursachen, sind es vor allem neurodegenerative Erkrankungen, die zu einem Schmeckverlust führen. Dazu gehört neben der Parkinson Krankheit auch der apoplektische Insult, mit den gleichen Folgen des schlechten Gesundheitsstatus'. Kommt es infolge eines Verschlusses einer Arterie oder der Blutung aus intrakraniellen Gefäßen zu einer zerebralen Minderperfusion, der durch diese Gefäße zu

versorgenden Hirnareale, resultieren dementsprechende Funktionsausfälle. Es ist wichtig, dass Kliniker ein Augenmerk auf die potentielle Dysgeusie, Hypogeusie und Ageusie im Rahmen eines Schlaganfalles richten, um damit einhergehender Malnutrition, Depression und sinkender Lebensqualität entgegen zu wirken. Läsionen in verschiedenen Hirnarealen, etwa der Pons, der Insula und spezifische Regionen des Thalamus sind bisher als prädisponierende Hirnregionen beschrieben (Dutta et al. 2013). In einer 2013 durchgeführten Studie (Dutta et al. 2013) wurde an einem Patientenfall demonstriert, wie sich Dysgeusie infolge eines Schlaganfalles auf das Leben einer 75-jährigen Patientin auswirkte. In der CT dieser Patientin wird ein hypodenses Areal im primären gustatorischen Kortex deutlich, welches die Schmeckstörung objektiviert.



**Abbildung 24** CT ohne Kontrastmittel etwa 30 Stunden nach Auftreten der Symptome zeigt hypodense Region im Bereich der linken anterioren Insula (Dutta et al. 2013).

Die Tatsache, dass Schmeckstörungen in diesem Rahmen aufgrund anderer klinischer Symptome wie Hemiplegie u.ä. wenig Beachtung finden oder vom Patienten anfangs nicht bewusst wahrgenommen werden, da Sensibilitätsstörungen, motorische Ausfälle etc. in der Akutphase offensichtlicher in Erscheinung treten, lässt die Diagnostik dieser Funktionseinschränkung des Schmeckens in den Hintergrund geraten. Oft fallen Beschwerden des Schmecksinns daher erst Monate nach dem Schlaganfall auf, die Konsequenzen sind dann meist schon eingetreten. Auch die hier beschriebene Patientin verlor 6,35 kg innerhalb eines halben Jahres und fühlte sich sozial isoliert, da sie an keinen gemeinsamen Mahlzeiten oder Restaurantbesuchen mehr Gefallen fand; sie wurde depressiv. Alle Patienten, die einen Schlaganfall erlitten und Probleme mit dem Essen oder dem Kochen bejahren, sollten daher nach der Akutbehandlung einer Prüfung der Riech- und

Schmeckfunktion unterzogen werden, um evtl. die Lebensqualität von Patienten nach Schlaganfall zu optimieren.

In einer weiteren in diesem Kontext interessanten Arbeit aus dem Jahr 2005 (Heckmann et al. 2005) wurden 102 Patienten mit akutem Schlaganfall hinsichtlich einer aufgetretenen Schmeckstörung untersucht. Mittels taste strips wurden die Patienten getestet, ob eine Schmeckstörung auftrat oder nicht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob und wie oft im Rahmen hämorrhagischer und ischämischer Schlaganfälle Schmeckstörungen auftreten und ob diese Resultate in einem Zusammenhang stehen mit der Art oder Lokalisation des Insults oder weiteren klinischen Zeichen. Ausschlusskriterien waren eine transitorische ischämische Attacke, Demenz, Insulte des Kleinhirns sowie ein betroffenes Sprachzentrum und damit mangelnde Kooperation im Rahmen der Studie. Heckmann et al. konnten zeigen, dass Schmeckstörungen in Abhängigkeit der betroffenen Hirnregion regelmäßig infolge von Schlaganfällen auftreten (Läsion im Frontalhirn: 59% Hypogeusie [16 von 27 Fällen]; Läsionen in allen anderen Teilen des Gehirns: 20% Hypogeusie [15 von 74 Fällen];  $P < 0,001$ ) und dies somit mehr Beachtung finden sollte.

Studien, die sich mit Schlaganfällen und Schmeckstörungen beschäftigen, bestätigen gleichzeitig die bisherigen anatomischen Erkenntnisse der Schmeckverarbeitung im Gehirn und können künftig weiter Aufschluss darüber geben, ob die in der Forschung erhobenen Resultate mit den Läsionen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen konform gehen. Es ist erstrebenswert, Kliniker für diese möglicherweise auftretende Komplikation zu sensibilisieren und den Patienten somit ein Optimum an Therapie zukommen zu lassen.

### **6.2.3 Unterschiede im Alter**

In der aktuellen Literatur liegen derzeit keinerlei vergleichbare Studien vor, die sich mit der Verarbeitung des Schmeckvorganges im Gehirn in Bezug auf definierte Altersklassen beschäftigen. Daher kann nach Interpretation der hier vorliegenden Resultate festgehalten werden, dass sich nach aktuellem Stand der Wissenschaft Unterschiede zwischen jungen und alten Menschen nicht nur subjektiv im Rahmen psychophysischer Testung finden, sondern mit Hilfe gustatorisch ereigniskorrelierter Potentiale auch objektiv darstellen lassen. Die Forschung der Chemosensorik im weiteren Sinne betrachtet, können Daten zur Verarbeitung olfaktorischer Verarbeitung von Sinnesreizen herangezogen werden, die eine signifikante Veränderung von OERPs im Laufe der Zeit zwischen Kindheit und Erwachsenenalter herausarbeiten konnten (Schriever et al. 2015). Es ist daher anzunehmen, dass in zukünftigen Studien eine Altersabhängigkeit der neuronalen Verarbeitung des Schmeckvorganges bestätigt werden kann.



Weitere Überlegungen, die diesen Ansatz untermauern, stammen von Onoda et al. Das Altern ist mit einem kognitiven Leistungsverlust verbunden, dem diese Studie auf den Grund ging. Ausgehend von der Theorie bestehender Netzwerke in unserem Gehirn, die sich im Laufe des Lebens entwickeln und stabile Systeme zur Verarbeitung aller im Gehirn ablaufender Prozesse bilden, wurde in dieser MRT-Studie untersucht, inwiefern sich diese gebildeten Netzwerke im Alter zurückentwickeln. Im Fokus stand hierbei die bilaterale Insula sowie der anteriore Gyrus cinguli, die als „salience network“ bezeichnet wurden. Zu verstehen sind diese Hirnregionen als Netzwerke, die nicht in einem starren Schema immer wieder kehrende, gelernte und automatisierte Abläufe realisieren, sondern vielmehr auf „hervorspringende“ Eindrücke der Außenwelt reagieren. Der Überfluss an Reizen, der auf den menschlichen Körper zu jeder Zeit einwirkt, muss durch das menschliche Gehirn sorgfältig gefiltert werden. Sei es das Sehen vielfältiger Objekte beim Laufen im Park, das selektive Hören des Gesprächspartners neben zahlreichen Nebengeräuschen usw. Die Insula scheint hierfür eine wichtige Rolle zu spielen. In ihren Ergebnissen wurde gezeigt, dass sich diese Netzwerke in Insula und Gyrus cinguli im Laufe des Lebens zurückbilden, auch Verbindungen, die beispielsweise das Hören und Sehen beeinflussen, nehmen mit dem Alter nachweislich ab. Folglich wurden auch der kognitive Leistungsverlust im Alter mit der Unterbrechung des „salience network“ in Verbindung gebracht (Onoda et al. 2012b).

Die Veränderbarkeit aller Strukturen des menschlichen Körpers, sei es sichtbar in Form der Hautalterung oder unsichtbar als Rückgang der grauen Substanz im Cerebellum (Lee et al. 2005) und dem Abbau neuronaler Netzwerke (Onoda et al. 2012b), lässt in seiner Gesamtheit nicht daran zweifeln, dass auch die mit dem Schmeckvorgang assoziierten Hirnareale im Laufe eines Menschenlebens einer gewissen Plastizität unterliegen, womit die vorliegenden Studienergebnisse untermauert würden.

### **6.3 Konsequenzen der vorliegenden Studie**

#### **6.3.1 Methodenkritik**

Die Teilnahme der Probanden an der vorliegenden Studie erfolgte freiwillig, war jedoch an einige Ein- und Ausschlusskriterien gebunden. Die erhaltenen Daten entsprechen demnach nicht dem Durchschnitt der Bevölkerung, sondern eines ausgewählten Kollektivs mit gutem Gesundheitszustand, was als Voraussetzung für den Erhalt der angestrebten Normdaten unumgänglich war. Dabei mussten wir uns auf die Glaubhaftigkeit der Probanden berufen, eine ärztliche Voruntersuchung fand nicht statt. Lediglich eine Prüfung der Riech- und Schmeckfunktion mittels 'sniffin' sticks und Schmeckstreifen gab Anhalt für die Funktionsfähigkeit dieses Sinnessystems der Probanden. Nachteil dieser Testmethoden ist die Abhängigkeit von der Mitarbeit der Probanden.

Zudem wurde versucht, eine ausgeglichene Geschlechterverteilung innerhalb der Probandengruppen zu erzielen. Mit zunehmendem Alter der Teilnehmer war es jedoch immer schwieriger, die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen zu können, was leider zum Ausschluss von motivierten Interessenten führte. Folglich ist eine Abnahme der Gesamtzahl der Probanden mit zunehmender Altersklasse zu verzeichnen, zudem gelang es auch nicht immer optimal, die Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppen zu gestalten. In verschiedenen Studien wurde deutlich, dass das Riech- und Schmeckvermögen der Frauen besser ist, als das der Männer (Doty et al. 1984; Wysocki and Gilbert 1989; Hüttenbrink et al. 2013; Sorokowska et al. 2014), auch nimmt das der Frauen im Alter verhältnismäßig weniger stark ab (Doty et al. 1984; Doty 1989). Betrachten wir die Verteilung der Geschlechter in der vorliegenden Studie muss festgestellt werden, dass in Altersklasse a 15 Männer und 15 Frauen teilnahmen, das Verhältnis in Gruppe b mit 41,7% zu 58,3% zugunsten der Männer ausfiel und in Gruppe c mit 72,7% zu 27,3% der Frauenanteil überwiegt. Auch in Altersgruppe d fanden sich mit 55,0% mehr Frauen, als Männer. Dies könnte die Ergebnisse der Vortests beeinflussen und erklären, warum Altersklasse c im Vergleich zu den jüngeren Probanden in Altersgruppe b bessere Durchschnittswerte in den Testergebnissen der 'sniffin' sticks aufweist. Es bleibt allerdings festzustellen, dass der Trend der Abnahme der Funktionsfähigkeit des Riechens und Schmeckens mit dem Alter statistisch bestätigt werden konnte und eine bessere Geschlechterverteilung die Kernaussagen dieser Studie nicht verändern würde.

Ein weiterer Faktor, den es zu bedenken gilt, ist die Abhängigkeit der Versuchsdurchführung von der Messtechnik und der Vigilanz sowie Konzentrationsfähigkeit der Probanden. Das Schmecken kann im Gehirn auf mehreren Wegen als elektrischer Impuls sichtbar gemacht

werden: einerseits durch elektrische Stimulation, andererseits mit Hilfe chemischer Substanzen. Die Elektrogustometrie ist eine Methode, um Dys- und Ageusie unterscheiden zu können, allerdings dient sie nicht der Differenzierung der 5 Schmeckqualitäten. Hinzu kommt eine Manipulation der Impulse durch Druck, Temperatur und Schmerz, die folglich keine klaren Aussagen über rein gustatorische Reize zulässt (Plattig 1969; Fitzsimons et al. 1999). Wir entschieden uns dafür, chemische Substanzen mittels Schmecklösungen auf die Zungen der Versuchsteilnehmer zu applizieren und infolge dessen ein rein gustatorisches Potential analysieren zu können. Wie eingangs erwähnt gibt es auch bei dieser Methode zahlreiche Störfaktoren, die es auszuschalten gilt. Eine präzise Vorbereitung und Durchführung der Messungen ist dabei unerlässlich. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden für alle Probanden gleiche Messbedingungen geschaffen, die Schmecklösungen stets in der gleichen Temperatur, mit der gleichen Konzentration und in identischer Pulsation appliziert. Die Vorbereitung der Teilnehmer, die Positionierung vor dem Gustometer, die Durchführung der Messungen, die Aufzeichnung der Daten sowie die anschließende Bearbeitung mit Cartool Software (Entfernen schlechter Elektroden und Interpolation) erfolgten ausnahmslos durch die gleiche Person, sodass interindividuelle Fehlerquellen bestmöglich vermieden wurden. Auch wenn dies, sowie technische Einstellungen, jederzeit vergleichbar waren, gibt es weitere mögliche Fehlerquellen. Nicht alle Probanden haben die gleiche Körpergröße und Konstitution. Obwohl der Auslass des Gustometers höhenverstellbar ist und alle Teilnehmer gebeten wurden, sich sehr entspannt zu positionieren und keine Muskeln aktiv anzuspannen, saßen die Probanden doch unterschiedlich komfortabel, was Bewegungsartefakte zur Folge hatte. Auch die Vigilanz der Teilnehmer, die Häufigkeit des Zwinkerns und Schluckens lässt sich durch den Untersucher nicht beeinflussen. Im Falle von zu häufigen Störungen der Messungen wurden diese durch Pausen unterbrochen, um dem Probanden die Möglichkeit zu geben, sich zu erholen und im weiteren Teil der Untersuchung wieder ohne zu zwinkern auf die Positionierung zu konzentrieren. Durch die Aufteilung der Messungen auf zwei Sitzungen wurde der Anstrengung der Teilnehmer Rechnung getragen. Die Artefakte konnten im Anschluss mittels Cartool Software eliminiert werden, wobei entsprechend der Messbedingungen eine unterschiedliche Anzahl an Korrekturen notwendig war und demnach pro Proband eine differierende Menge an Impulsen verwertbar blieb. Es wurde jedoch stets ein Minimum (12 Impulse) an ausreichend guten ereigniskorrelierten Potentialen zur weiteren Verarbeitung vorausgesetzt.

### 6.3.2 Stellenwert der Altersabhängigkeit des Schmeckvermögens im Alltag, der Klinik und Industrie

In Zeiten, in denen Adipositas zur Volkskrankheit geworden ist, Fastfood mit dem beliebten umami-Geschmack immer mehr an Bedeutung gewinnt und der Blutdruck der Bevölkerung nicht durch diese Fakten, sondern durch das Verspeisen zu salzhaltiger Nahrung in die Höhe getrieben wird, ist es unabdingbar, sich auf wissenschaftlicher Ebene mit dem Thema der Ernährung und somit dem Schmecken und Schmeckstörungen auseinander zu setzen. Vor allem ältere Menschen neigen durch ihren Riech- und Schmeckverlust dazu, Speisen zu überwürzen. Hinzu kommt, dass dies von den Betroffenen nicht oder nur selten bemerkt wird, da sie sich, wie eine Studie von Bartoshuk zeigte, ihrer erhöhten Schmeckschwelle nicht bewusst sind. So scheint der ältere Proband mit einer höheren Konzentration der Geschmäcker subjektiv so gut zu schmecken, wie ein junger Mensch. Auch der Vergleich des Einzelnen in der immer gleichen Altersgruppe trägt subjektiv dazu bei, dass man das eigene Empfinden als normal einstuft (Bartoshuk 1989; Shu et al. 2009). Ältere Menschen greifen in Folge dessen zu einseitiger Nahrung, verlieren die Lust am Essen, an der Zubereitung der Nahrungsmittel und ernähren sich zunehmend von industriell zubereiteten, überwürzten Speisen. Die durchschnittliche Salzaufnahme der Erwachsenen beträgt etwa 9-12 g pro Tag, empfohlen werden 5 g (Weltgesundheitsorganisation WHO). Der demographische Wandel, der unsere Gesellschaft in Zukunft zunehmend altern lässt, sollte bewirken, dass wir ein besonderes Augenmerk auf diese Bevölkerungsgruppe und deren Gesundheit legen. Das nachlassende Empfinden für verschiedene Substanzen im Alter und die daraus folgenden Ernährungsgewohnheiten, führen zu einem schlechten Gesundheitszustand, nicht zuletzt zu Adipositas. In einer Untersuchung mit 41 Frauen und 25 Männern wurde allerdings auch festgestellt, dass ein bereits vorbestehendes Übergewicht Einfluss auf die Chemosensorik nimmt. Mit 'sniffin' sticks und Schmeckstreifen wurde das Riech- und Schmeckvermögen der 66 Probanden (20-56 Jahre) getestet, welche in vier Gruppen, entsprechend ihres BMI, eingeteilt waren. Ein signifikanter Einfluss auf das Riechvermögen sei mit zunehmender Körpermasse zu erkennen ( $F(3,62)=2,79$ ;  $p<0,047$ ), auch das Erkennen der Schmeckrichtung salzig fiel den Teilnehmern schwerer, je höher ihr BMI ist ( $F(3,62)=3,06$ ;  $p<0,035$ ). Die Daten zeigen demnach, dass Übergewicht die Riech- und Schmeckfunktion sonst gesunder Probanden beeinträchtigt (Skrandies and Zschieschang 2015). Folglich scheint es ein Kreislauf zwischen diesen Faktoren des Übergewichts und der abnehmenden Riech- und Schmeckfunktion zu sein, die einander bedingen.

Schon frühere Studien rufen zu diesem Bewusstsein auf und mahnen zu einer ausgewogenen Ernährung. Mit Hilfe schmackhaft angerichteter Nahrung und somit

ansprechenden Alternativen für die ältere Bevölkerung bildet dies eine wichtige Grundlage, um die Gesundheit zu fördern und zu erhalten. Dies stellt eine Herausforderung, gleichzeitig aber auch neue Möglichkeiten für die Nahrungsmittelindustrie dar (Murphy 1993; Schiffman 1993). Eine aktuelle Studie befasst sich mit dieser Problematik und zeigt, dass es beispielsweise möglich ist, den Salzgehalt in der Nahrung bewusst zu reduzieren. Die Nahrungsmittelindustrie habe das Potential, hier für Veränderung zu sorgen. Gleichzeitig wird aber auch darauf aufmerksam gemacht, dass es vor allem das Bewusstsein in den Menschen ist, das erzeugt werden muss, um Veränderung zu schaffen (Dötsch-Klerk et al. 2015). Ältere Menschen sollten folglich ermuntert werden, saisonale Zutaten zu verwenden und es vermeiden, zu stark mit Zucker und Salz nachzuwürzen, da dies zudem zu Zahnproblemen führt (Winkler et al. 1999). Mondon et al. bezeichneten Schmeck- und Riechstörungen sogar als geriatrisches Syndrom, dessen sich Geriater in ihrem klinischen Alltag bewusst werden müssen (Mondon et al. 2014). Es ist an der Zeit, so auch Haase et al., den Mechanismen ungesunder Ernährung auf den Grund zu gehen (Haase et al. 2011). Folglich ist es nicht nur Aufgabe des Kliniklers und der Industrie, sich diesem wachsenden Problem anzunehmen, sondern die jedes Einzelnen, um somit einen Beitrag für die Gesundheit in unserer Gesellschaft zu leisten.

### **6.3.3 Ausblick**

Die Forschung des Riechens und Schmeckens wirft immer wieder neue Fragen auf, in deren Beantwortung in Zukunft weiterhin Herausforderungen zu sehen sind. Schon 2009 appellierten Schuster et al., gustatorische Testverfahren zu etablieren, die nicht von der Mitarbeit der Probanden abhängig sind und so auch in gutachterlichen Fragestellungen, bei Rentenbegehren und dergleichen als objektive Messverfahren Anwendung finden können (Schuster et al. 2009). Die Methoden der Testung der vorliegenden Dissertation und deren Ergebnisse in die klinische Routine zu integrieren, sowie zu erweitern, sollte als langfristiges Ziel angestrebt werden. Da die Teilnahme der Probanden an der vorliegenden Studie Ein- und Ausschlusskriterien unterlag, repräsentieren die Messergebnisse Normdaten gesunder Menschen im Alter zwischen 18 und 70 Jahren. So wurden beispielsweise Riech- und Schmeckstörungen, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen, Parkinson etc. schon vor Beginn der Studie bei allen Teilnehmern ausgeschlossen. Bei etwa 5% (entspricht rund 4 Millionen Menschen; plus hohe Dunkelziffer) der deutschen Bevölkerung wurde ein manifester Diabetes mellitus (Stand 2014, Deutsches Diabetes-Zentrum (DDZ)) diagnostiziert, etwa 100.000 aller Menschen in Deutschland leiden an (terminaler) Niereninsuffizienz, die Anzahl steigt um 3-5%/Jahr (Stand 2014, Deutsche Gesellschaft für Nephrologie).

Allein diese beiden Kriterien zeigen, dass in Zukunft weitere Untersuchungen angestrebt werden sollten, die sich der Datenerfassung von Schmeckverarbeitung bei vorliegenden Nebenerkrankungen zur Aufgabe machen. Eine Studie von Naka et al. aus dem Jahr 2010 untersuchte 67 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 2 hinsichtlich der klinischen Signifikanz von Riech- und Schmeckstörungen. Bei unkompliziertem Diabetes mellitus waren die Ergebnisse vergleichbar mit denen der 29 gesunden Studienteilnehmer. Signifikante Unterschiede in Form eines nachlassenden Riechvermögens hingegen ergaben sich, sobald Nebenerkrankungen auftraten. Dabei erzielten Patienten mit einem Typ 2 Diabetes geringere Werte als solche, bei denen ein Diabetes mellitus Typ 1 vorlag (Naka et al. 2010). Diese Erkenntnisse könnten zusammen mit der vorliegenden Studie als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

Hinzu kommt, dass das langfristige Ziel sein soll, Schmeckstörungen zu detektieren und folglich objektivieren zu können. Diese Darstellung von Pathologien gelingt zum einen als Abweichung der Messungen von den hier vorliegenden Normdaten. Zudem ist es wünschenswert, weitere Untersuchungen an kommunikationsfähigen Patienten mit Schmeckstörung durchzuführen, um auch dort eventuell charakteristische Veränderungen der Topographie des Schmeckprozesses herausarbeiten zu können. So zeigen sich Ableitungen im EEG bei Patienten mit einem metallischen Geschmack im Mund ggf. anders, als solche mit einem Verlust des Schmeckens von süß oder salzig usw. Es werden zahlreiche unterschiedliche Störungen dieses komplexen Sinnessystems diagnostiziert, weshalb es eine große Herausforderung darstellt, diese im EEG sichtbar zu machen und anhand eines ausreichend großen Patientenkollektivs zu normieren. Gelingt dies als Fortsetzung der hier vorliegenden Arbeit, ist in der objektivierten Diagnose von Dys- und Ageusie ein großer Schritt gelungen.

## **7 Zusammenfassung**

### **7.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache**

Eine Minderung des Schmeck- und Riechvermögens im Alter ist beim Menschen weitreichend bekannt und konnte in den vergangenen Jahrzehnten in zahlreichen Studien belegt werden (Murphy und Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014). Aber worin liegen die dies verursachenden physiologischen Veränderungen zwischen Jung und Alt? Derzeit existieren verschiedene nicht-invasive Techniken zur Bildgebung des Zentralen Nervensystems, welche eine Untersuchung der Hirnfunktion, beziehend auf sensorische Wahrnehmung, erlauben. Eine der zuverlässigsten Methoden ist die Ableitung von Signalen mittels EEG. Sie gewährleistet eine Lokalisation aktivierter Neurone im Kortex, bei hoher zeitlicher Auflösung (ca. Millisekunden).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, psychophysische Methoden und elektrische Bildgebung des zentralen Nervensystems mittels GEKP zu nutzen, um die Altersabhängigkeit der Schmeckverarbeitung im Gehirn auf subjektiver und elektrophysiologischer Ebene zu untersuchen. Bisher veröffentlichte klinische Untersuchungen basieren auf subjektiven Testungen, welche die Mitarbeit der Probanden bzw. Patienten erfordern. Eine Ermittlung der Ursache vorliegender Schmeckstörungen ist oft nur schwer oder gar nicht möglich. Mit Hilfe der ermittelten Messwerte sollen Normdaten zur Verfügung stehen, die im klinischen Alltag in der Diagnose von Schmeckstörungen einer Objektivierung der Angaben der Patienten dienen, um Aggravierung zu vermeiden sowie kognitiv oder sprachlich nicht aussagekräftige Patienten (z.B. Kinder oder demenzkranke Patienten) gleichwertig diagnostizieren und folglich behandeln zu können.

Die Arbeitshypothese ist ein mit dem Alter abnehmendes Riech- und Schmeckvermögen, welches mit einer Änderung der neuronalen Signaltransduktion im zentralen Nervensystem einhergeht und mittels bildgebender Verfahren im EEG dargestellt werden kann.

Beginnend mit Fragebögen, u.a. der Anamnese der Probanden und einem Wortschatztest sowie anschließender Testung des Riech- und Schmeckvermögens mittels „sniffin' sticks“ und „taste strips“ zur Überprüfung einer Normosmie und Normogeusie, konnten der Studie insgesamt 96 gesunde, sowohl weibliche, als auch männliche Probanden, zugeführt werden. Die Gruppe wurde in 4 Altersklassen aufgeteilt: Altersgruppe a) 18-30 Jahre; b) 31-44 Jahre; c) 45-60 Jahre; d) 61-70 Jahre. In einer zweiten und dritten Sitzung à 50 Minuten wurden die GEKP mittels EEG abgeleitet, wozu eine standardisierte Vorbereitung der Teilnehmer und

ein initiales Training erfolgten. Die Ableitung der GEKPs erfolgte mittels eines 128-Kanal-EEGs und 8 externer Elektroden (BioSemi, Amsterdam, NL). Während sich die Probanden in einer komfortablen Sitzhaltung vor dem Auslass des Gustometers (GU001, Burghart, Wedel, Deutschland) befanden, der sich etwa 5 cm vor der herausgestreckten Zunge befand, erfolgte die gustatorische Stimulation.

Die Schmecklösungen umfassten die fünf iso-intensen Schmeckrichtungen süß, sauer, salzig, bitter und umami. Eingebettet in einen konstanten Luftstrom, wurden diese als gepulste Stimuli mit einer Dauer von 250 ms und einem randomisierten ISI (18-22 s; im Mittel 20 s) auf die Zungen der Probanden appliziert. Es erfolgten 60 Wiederholungen pro Schmeckrichtung. Die Lösungen waren stets auf 37°C (Körpertemperatur) temperiert. Während dieser Prozedur wurde die gustatorische Reizantwort kontinuierlich registriert und gespeichert (Software BioSemi ActiveView 605).

Die Resultate dieser Aufzeichnungen wurden mit Cartool Software (functional brain mapping lab, version 3.52) anschließend in mehreren Schritten analysiert. Zunächst wurden für jeden Kanal eines jeden Probanden die Signale gefiltert, schlechte Elektroden verworfen und die Daten interpoliert. Anschließend erfolgte die microstate segmentation für jede Gruppe, in welcher aus dem vorliegenden Datensatz *cluster maps* (stabile Positionen im Gehirn) berechnet wurden. Es resultierte eine gewisse Anzahl an *maps*, welche Grund zu der Annahme geben, den gustatorischen Prozess am besten zu repräsentieren. Schließlich wurde eine Lokalisierung der Quelle der neuronalen Aktivität (source localisation) einer jeden elektrophysiologischen *map* durchgeführt, um beteiligte Hirnareale zu identifizieren (Brunet et al. 2011).

Die Ergebnisse konnten im Rahmen der Vortests zum einen eine Abnahme des Riech- und Schmeckvermögens mit zunehmendem Alter bestätigen. Innerhalb der anatomischen Strukturen des Gehirns konnte der Schmeckvorgang zum anderen für jede Altersklasse nachvollzogen werden. Dabei wird die Verarbeitung des Schmeckens, unabhängig vom Alter, anfangs im anterioren und mittleren Teil der Insularegion sowie in dem darüber liegenden Operculum (primärer gustatorischer Kortex; map 1 und 2) beschrieben. Es folgt die weitere Erregung des linken und rechten Gyrus frontalis inferior sowie des rechten Gyrus temporalis superior (map 4). Hierbei fällt auf, dass die Aktivierung dieser Hirnareale (map 4) mit zunehmendem Alter an Dauer zunimmt, der Schmeckvorgang bei Probanden der Altersklassen a und b anschließend jedoch im links parietalen und frontalen Operculum und rechtem Cerebellum (map 5) beendet wird. Die Präsenz dieser map 5 ist bei älteren Probanden sehr kurz, bis sie in Altersgruppe d interessanterweise überhaupt nicht mehr aktiviert wird. Damit scheint das Cerebellum eine Schlüsselrolle in der Schmeckverarbeitung



zu spielen. Passend dazu existiert eine Studie von Lee aus dem Jahre 2005 (Lee et al. 2005), die den Verlust grauer Substanz im Cerebellum und damit einhergehend eine abnehmende intellektuelle Kapazität im Alter beschreibt. Denkbar ist also auch eine Dichteabnahme der grauen Masse im Kleinhirn, die Einfluss auf unsere Daten nehmen könnte. Mit diesen Ergebnissen werden bisher veröffentlichte Studien hinsichtlich eines getrennten primären und sekundären gustatorischen Kortex bestätigt.

Schlussfolgernd kann die Arbeitshypothese mit der vorliegenden Dissertation bestätigt werden. Die Sensitivität elektrischer Bildgebung des Zentralen Nervensystems mittels GEKP in der Darstellung der Altersabhängigkeit der Schmeckverarbeitung kann gezeigt werden. Die Daten sollen als Normwerte im klinischen Alltag bei der objektiven Diagnostik und Behandlung gustatorischer Dysfunktionen dienen. Vertiefend sind basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen Untersuchungen an Patienten mit Schmeckstörungen wünschenswert, um eine gegebenenfalls abweichende neuronale Verarbeitung des Schmeckvorgangs für verschiedene Pathologien dieses Sinnessystems zu ermitteln und im Rahmen klinischer Arbeit anwenden zu können.

## 7.2 Zusammenfassung in englischer Sprache - summary

The physiological aging of taste and smell in humans is widely known. During the last two decades several studies suggest perceptual limitations in smell and taste with the increase of the age (Murphy and Gilmore 1989; Murphy 1993; Schiffman 1993; Winkler et al. 1999; Mondon et al. 2014). But what are the physiological changes to induce this effect? To date, non-invasive neuroimaging techniques allow investigating brain functions related to sensory perceptions. One of the most authoritative is the electrical neuroimaging based on multichannel EEG acquisition, which allows the cortical localization of the firing neurons together with a high temporal resolution (ca. ms).

To this, in the present study we aimed to apply psychophysics and electrical neuroimaging based on gERPs to investigate age-related differences in the processing of gustatory information at subjective and electrophysiological sensory level. Clinical tests, reported until now, are mostly subjective, needing the cooperation of the patients, and they hardly detect the origin of idiopathic taste disease. Our results instead, based on electrophysiological data, point to produce normative data to be used in a standardized clinical setting to diagnose patients with a loss of gustatory function. This diagnose can be easily applied also to patients unable to cooperate properly, like children or afflicted by dementia or neurodegenerative diseases.

The hypothesis of this work is that the decrease of olfactory and taste function with the age is also related to a modification of neurosignal transduction at the central system level and can be detected with electro imaging techniques.

After filling in questionnaires, including the medical history and the cognitive functions (WST-test) of the test person and performing olfactory and gustatory screening, ("sniffin' sticks"-, "taste strips"-test) to check the subject's normal function, a total of 96 healthy male and female subjects participated in the study. The volunteers were classified in four age groups: group a) 18-30y; b) 31-44y; c) 45-60y; d) 61-70y. The full experimental run included two sessions of gERP acquisition, which required an initial training of the subject. To record gERPs a 128-channel EEG system (BioSemi, Amsterdam, NL) was used. While they were comfortably sitting in a dedicated EEG room, with their foreheads resting on an apposite support, they protruded their tongue in front of the outlet of the gustometer (GU001, Burghart, Wedel, Deutschland) to receive the gustatory stimulation.

The tastants consisted of five iso-intense basic liquid solution of sweet, sour, salty, bitter and umami. Further parameters were: 60 repetitions per condition; 250 ms of stimulus duration; ISI of 20 s (averaged from 18 to 22 s) and temperature of 37°C (internal body temperature).

During this procedure the 128 active electrodes on a standard 10/20 montage (BioSemi, Amsterdam, NL) were connected with the amplifier and the signal was registered and stored on the computer using BioSemi ActiveView 605- software (Biosemi, Amsterdam, NL).

Cartool software (functional brain mapping lab, v. 3.52) was used for data analysis. First step of the signal processing, on each subject and each channel, included: filtering, artifact rejecting and electrodes interpolation. After this, stable map topographies for each group were defined using microstate segmentation algorithm. The result gave rise to a certain number of maps (also called cluster maps) that best represented the whole gustatory process. Finally the source localisation of each electrophysiological map was performed to identify the involved brain structures (Brunet et al. 2011).

The results of the psychophysical tests indicated reduced smell and taste function in the older group, which confirms the decrease of both olfactory and gustatory functions with age. The neurophysiological results pointed out five stable maps to describe the gustatory processing. Independent from taste condition and age group, the process starts coherently in the left and right orbitofrontal/prefrontal cortex, left inferior frontal gyrus (insula and operculum), left cerebellum and left superior temporal gyrus (map 1) and is generally followed by activation in the left and right prefrontal cortex, right insula and frontal operculum as well as the right inferior frontal gyrus (map 2), with some exceptions. Interestingly, the presence of map 4, which is associated with sources in left and right inferior frontal and right superior temporal gyrus, becomes longer with increasing age. Finally, map 5, representing the left parietal/frontal operculum and right cerebellum, ends the process for age groups a and b, while it becomes shorter for group c and is almost absent for the oldest subjects in age group d.

The short presence of map 5 for elderly people, which was linked to a source in the cerebellum, suggests that the cerebellum may play an important role in the reduction of olfactory and gustatory functions at that stage. Interesting is, that this is similarly to what has been found for intellectual capacity in healthy aged population (Lee et al. 2005). So maybe there is also the reduction of neurotransmission link within the cortex which had an influence on the data we found.

Source analysis revealed areas in primary and secondary gustatory cortex for maps 1 and 2 which confirms the results of former studies of segregated primary and secondary gustatory cortex.

In conclusion, the working hypothesis of the present study can be confirmed. We demonstrate the sensitivity of electro neuroimaging technique to detect gradients of gustatory

functions with age. These results are the basis for further application in the diagnosis of gustatory/olfactory diseases. Future development of this research line considers the definition of a standard protocol for normative data to be used in clinical practice.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ackerman BH, Kasbekar N. 1997. Disturbances of Taste and Smell Induced by Drugs. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 17: 482–496.
- Ahne G, Erras A, Hummel T, Kobal G. 2000. Assessment of gustatory function by means of tasting tablets. *The Laryngoscope* 110: 1396–1401.
- Araujo IE de, Simon SA. 2009. The gustatory cortex and multisensory integration. *Int. J. Obes.* 2005 33: S34–S43.
- Bachmanov AA, Beauchamp GK, Tordoff MG. 2002. Voluntary Consumption of NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, and NH<sub>4</sub>Cl Solutions by 28 Mouse Strains. *Behav. Genet.* 32: 445–457.
- Bartoshuk LM. 1989. Taste. Robust across the age span? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 561: 65–75.
- Bastian AJ. 2011. Moving, sensing and learning with cerebellar damage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21: 596–601.
- Beckett EL, Martin C, Yates Z, Veysey M, Duesing K, Lucock M. 2014. Bitter taste genetics - the relationship to tasting, liking, consumption and health. *Food Funct.*
- Beckstead RM, Morse JR, Norgren R. 1980. The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 190: 259–282.
- Berlit P. 2006. *Klinische Neurologie.* Springer.
- Bojanowski V, Hummel T. 2012. Retronasal perception of odors. *Physiol. Behav.* 107: 484–487.
- Boughter JD, Bachmanov AA. 2007. Behavioral genetics and taste. *BMC Neurosci.* 8: S3.
- Brunet D, Murray MM, Michel CM. 2011. Spatiotemporal analysis of multichannel EEG: CARTOOL. *Comput. Intell. Neurosci.* 2011: 813870.
- Cereda C, Ghika J, Maeder P, Bogousslavsky J. 2002. Strokes restricted to the insular cortex. *Neurology* 59: 1950–1955.
- Chen X, Gabito M, Peng Y, Ryba NJP, Zuker CS. 2011. A Gustotopic Map of Taste Qualities in the Mammalian Brain. *Science* 333: 1262–1266.
- Combarros O, Miro J, Berciano J. 1994. Ageusia associated with thalamic plaque in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 34:344–346.
- Cowart BJ, Yokomukai Y, Beauchamp GK. 1994. Bitter taste in aging: compound-specific decline in sensitivity. *Physiol. Behav.* 56: 1237–1241.
- D'Angelo E, Casali S. 2012. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Front. Neural Circuits* 6: 116.
- Deems DA, Doty RL, Settle R, et al. 1991. SMell and taste disorders, a study of 750 patients from the university of pennsylvania smell and taste center. *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.* 117: 519–528.

- Deshpande DA, Wang WCH, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JSK, Liggett SB. 2010. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat. Med.* 16: 1299–1304.
- Djordjevic J, Zatorre RJ, Jones-Gotman M. 2004. Effects of perceived and imagined odors on taste detection. *Chem. Senses* 29: 199–208.
- Dötsch-Klerk M, Pmm Goossens W, Meijer GW, Het Hof KH van. 2015. Reducing salt in food; setting product-specific criteria aiming at a salt intake of 5 g per day. *Eur. J. Clin. Nutr.*
- Doty RL. 1989. Influence of age and age-related diseases on olfactory function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 561: 76–86.
- Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L, Rosenberg L. 1984. Smell identification ability: changes with age. *Science* 226: 1441–1443.
- Dutta TM, Josiah AF, Cronin CA, Wittenberg GF, Cole JW. 2013. Altered taste and stroke: a case report and literature review. *Top. Stroke Rehabil.* 20: 78–86.
- Faurion A, Kobayakawa T, Cerf-Ducastel B. 2005. Cerebral imaging in taste. *Chem. Senses* 30 Suppl 1: i230–231.
- Fikentscher R, Roseburg B, Spinar H, Bruchmüller W. 1977. Loss of taste in the elderly: sex differences. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2: 183–189.
- Fitzsimons M, Sheahan NF, Putten W van der, Malone JF. 1999. The application of d.c. electrical stimulation in evoking and recording gustatory brain potentials. *Physiol. Meas.* 20: 385–400.
- Frey S, Petrides M. 1999. Re-examination of the human taste region: a positron emission tomography study. *Eur. J. Neurosci.* 11: 2985–2988.
- Funakoshi M, Kawamura Y. 1971. Summated cerebral evoked responses to taste stimuli in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 30: 205–209.
- Galindo MM, Voigt N, Stein J, Lengerich J van, Raguse J-D, Hofmann T, Meyerhof W, Behrens M. 2012. G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem. Senses* 37: 123–139.
- Goodspeed RB, Gent JF, Catalanotto FA. 1987. Chemosensory dysfunction. Clinical evaluation results from a taste and smell clinic. *Postgrad. Med.* 81: 251–257, 260.
- Goto N, Yamamoto T, Kaneko M, Tomita H. 1983. Primary pontine hemorrhage and gustatory disturbance: clinicoanatomic study. *Stroke* 14: 507–511.
- Haase L, Green E, Murphy C. 2011. Males and females show differential brain activation to taste when hungry and sated in gustatory and reward areas. *Appetite* 57: 421–434.
- Hausser-Hauw C, Bancaud J. 1987. Gustatory hallucinations in epileptic seizures. Electrophysiological, clinical and anatomical correlates. *Brain J. Neurol.* 110 ( Pt 2): 339–359.
- Heckmann JG, Stössel C, Lang CJG, Neundörfer B, Tomandl B, Hummel T. 2005. Taste disorders in acute stroke: a prospective observational study on taste disorders in 102 stroke patients. *Stroke J. Cereb. Circ.* 36: 1690–1694.

- Henkin RI, Comiter H, Fedio P, O'Doherty D. 1977. Defects in taste and smell recognition following temporal lobectomy. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 102: 146–150.
- Höfer D, Püschel B, Drenckhahn D. 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 6631–6634.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJP, Zuker CS. 2006. The Cells and Logic for Mammalian Sour Taste detection. *Nature* 442: 934–938.
- Hummel C, Frasnelli J, Gerber J, Hummel T. 2007a. Cerebral processing of gustatory stimuli in patients with taste loss. *Behav. Brain Res.* 185: 59–64.
- Hummel T, Genow A, Landis BN. 2010. Clinical assessment of human gustatory function using event related potentials. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81: 459–464.
- Hummel T, Kobal G, Gudziol H, Mackay-Sim A. 2007b. Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 264: 237–243.
- Hüttenbrink K-B, Hummel T, Berg D, Gasser T, Hähner A. 2013. Olfactory dysfunction: common in later life and early warning of neurodegenerative disease. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 110: 1–7, e1.
- Iannilli E, Noennig N, Hummel T, Schoenfeld AM. 2014. Spatio-temporal correlates of taste processing in the human primary gustatory cortex. *Neuroscience* 273: 92–99.
- Iannilli E, Singh PB, Schuster B, Gerber J, Hummel T. 2012. Taste laterality studied by means of umami and salt stimuli: an fMRI study. *NeuroImage* 60: 426–435.
- Imoscopi A, Inelmen EM, Sergi G, Miotto F, Manzato E. 2012. Taste loss in the elderly: epidemiology, causes and consequences. *Aging Clin. Exp. Res.* 24: 570–579.
- Ito N, Suzuki N (1993) [Ipsilateral gustatory disturbance by thalamic hemorrhage]. *Rinsho Shinkeigaku* 33:559-561.
- Ji M, Su X, Su X, Chen Y, Huang W, Zhang J, Gao Z, Li C, Lu X. 2014. Identification of Novel Compounds for Human Bitter Taste Receptors. *Chem. Biol. Drug Des.* n/a–n/a.
- Jyoichi T, Honda H, Noda Y, Shimojo S, Miyahara T (1985) [A case of sensory disturbance of left 5th finger associated with gustatory disturbance]. *Rinsho Shinkeigaku* 25:1066-1069.
- Kinomura S, Kawashima R, Yamada K, Ono S, Itoh M, Yoshioka S, Yamaguchi T, Matsui H, Miyazawa H, Itoh H. 1994. Functional anatomy of taste perception in the human brain studied with positron emission tomography. *Brain Res.* 659: 263–266.
- Kobal G. 1985. Gustatory evoked potentials in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 62: 449–454.
- Kobal G, Hummel T, Sekinger B, Barz S, Roscher S, Wolf S. 1996. “Sniffin’ sticks”: screening of olfactory performance. *Rhinology* 34: 222–226.
- Kobayakawa T, Endo H, Ayabe-Kanamura S, Kumagai T, Yamaguchi Y, Kikuchi Y, Takeda T, Saito S, Ogawa H. 1996. The primary gustatory area in human cerebral cortex studied by magnetoencephalography. *Neurosci. Lett.* 212: 155–158.

- Landis BN, Welge-Luessen A, Brämerson A, Bende M, Mueller CA, Nordin S, Hummel T. 2009. "Taste Strips" - a rapid, lateralized, gustatory bedside identification test based on impregnated filter papers. *J. Neurol.* 256: 242–248.
- Lee BC, Hwang SH, Rison R, Chang GY. 1998. Central pathway of taste: clinical and MRI study. *Eur Neurol* 39:200-203.
- Lee J-Y, Lyoo IK, Kim S-U, Jang H-S, Lee D-W, Jeon H-J, Park S-C, Cho MJ. 2005. Intellect declines in healthy elderly subjects and cerebellum. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 59: 45–51.
- Liao J, Schultz PG. 2003. Three sweet receptor genes are clustered in human chromosome 1. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 14: 291–301.
- Lindemann B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219–225.
- Li X. 2009. T1R receptors mediate mammalian sweet and umami taste. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 733S–737S.
- Min BC, Sakamoto K. 1998. Influence of Sweet Suppressing Agent on Gustatory Brain Evoked Potentials Generated by Taste Stimuli. *Appl. Human Sci.* 17: 9–17.
- Mondon K, Naudin M, Beauvils E, Atanasova B. 2014. Perception of taste and smell in normal and pathological aging: an update. *Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 12: 313–320.
- Mueller C, Kallert S, Renner B, Stiassny K, Temmel AFP, Hummel T, Kobal G. 2003. Quantitative assessment of gustatory function in a clinical context using impregnated "taste strips." *Rhinology* 41: 2–6.
- Murphy C. 1993. Nutrition and chemosensory perception in the elderly. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 3–15.
- Murphy C, Gilmore MM. 1989. Quality-specific effects of aging on the human taste system. *Percept. Psychophys.* 45: 121–128.
- Murphy C, Morgan CD, Geisler MW, Wetter S, Covington JW, Madowitz MD, Nordin S, Polich JM. 2000. Olfactory event-related potentials and aging: normative data. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 36: 133–145.
- Murphy C, Wetter S, Morgan CD, Ellison DW, Geisler MW. 1998. Age effects on central nervous system activity reflected in the olfactory event-related potential. Evidence for decline in middle age. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 598–607.
- Naka A, Riedl M, Luger A, Hummel T, Mueller CA. 2010. Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 267: 547–550.
- Nakajima Y, Utsumi H, Takahashi H. 1983. Ipsilateral disturbance of taste due to pontine haemorrhage. *J Neurol* 229:133-136.
- Nakamura E. 2011. One Hundred Years since the Discovery of the "Umami" Taste from Seaweed Broth by Kikunae Ikeda, who Transcended his Time. *Chem. - Asian J.* 6: 1659–1663.



- Nederkoorn C, Jansen A, Havermans RC. 2014. Feel your food. The influence of tactile sensitivity on picky eating in children. *Appetite* 84C: 7–10.
- Noda S, Hiromatsu K, Umezaki H, Yoneda S. 1989. Hypergeusia as the presenting symptom of a posterior fossa lesion. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 52: 804–805.
- Nordin S, Brämerson A, Bringlöv E, Kobal G, Hummel T, Bende M. 2007. Substance and tongue-region specific loss in basic taste-quality identification in elderly adults. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 264: 285–289.
- Ogawa H, Wakita M, Hasegawa K, Kobayakawa T, Sakai N, Hirai T, Yamashita Y, Saito S. 2005. Functional MRI detection of activation in the primary gustatory cortices in humans. *Chem. Senses* 30: 583–592.
- Ohla K, Busch NA, Lundstrom JN. 2012. Time for Taste--A Review of the Early Cerebral Processing of Gustatory Perception. *Chemosens. Percept.* 5: 87–99.
- Onoda K, Ikeda M. 1999. Gustatory disturbance due to cerebrovascular disorder. *Laryngoscope* 109:123-128.
- Onoda K, Ikeda M, Sekine H, Ogawa H. 2011. Clinical study of central taste disorders and discussion of the central gustatory pathway. *J. Neurol.* 259: 261–266.
- Onoda K, Ikeda M, Sekine H, Ogawa H. 2012a. Clinical study of central taste disorders and discussion of the central gustatory pathway. *J. Neurol.* 259: 261–266.
- Onoda K, Ishihara M, Yamaguchi S. 2012b. Decreased functional connectivity by aging is associated with cognitive decline. *J. Cogn. Neurosci.* 24: 2186–2198.
- Onoda K, Kobayakawa T, Ikeda M, Saito S, Kida A. 2005. Laterality of human primary gustatory cortex studied by MEG. *Chem Senses* 30:657-666.
- Plattig KH. 1969. [Electric taste. Stimulus intensity dependent evoked brain potentials following electric stimulation of the tongue in humans]. *Z. Für Biol.* 116: 161–211.
- Pratt H, Aminoff M, Nuwer MR, Starr A. 1999. Short-latency auditory evoked potentials. The International Federation of Clinical Neurophysiology. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl.* 52: 69–77.
- Pritchard TC, Hamilton RB, Norgren R. 2000. Projections of the Parabrachial Nucleus in the Old World Monkey. *Exp. Neurol.* 165: 101–117.
- Pritchard TC, Macaluso DA, Eslinger PJ. 1999. Taste perception in patients with insular cortex lesions. *Behav. Neurosci.* 113: 663–671.
- Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. 2013. New roles for the cerebellum in health and disease. *Front. Syst. Neurosci.* 7: 83.
- Schaupp H. 1971. [Problems of objective gustometry]. *Z. Für Laryngol. Rhinol. Otol. Ihre Grenzgeb.* 50: 208–213.

- Schiffman SS. 1993. Perception of taste and smell in elderly persons. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 17–26.
- Schmahmann JD. 2010. The role of the cerebellum in cognition and emotion: personal reflections since 1982 on the dysmetria of thought hypothesis, and its historical evolution from theory to therapy. *Neuropsychol. Rev.* 20: 236–260.
- Schmidt, K.-H., Metzler, P. 1992. Wortschatztest (WST). Weinheim, Beltz Test GmbH.
- Schmidt RF, Lang F. 2007. *Physiologie Des Menschen: Mit Pathophysiologie*. Springer London, Limited.
- Schoenfeld MA, Neuer G, Tempelmann C, Schüssler K, Noesselt T, Hopf J-M, Heinze H-J. 2004. Functional magnetic resonance tomography correlates of taste perception in the human primary taste cortex. *Neuroscience* 127: 347–353.
- Schriever VA, Boerner C, Mori E, Smitka M, Hummel T. 2015. Changes of olfactory processing in childhood and adolescence. *Neuroscience* 287: 15–22.
- Schuster B, Iannilli E, Gudziol V, Landis BN. 2009. Gustatory testing for clinicians. *B-ENT* 5 Suppl 13: 109–113.
- Shikama Y, Kato T, Nagaoka U, Hosoya T, Katagiri T, Yamaguchi K, Sasaki H. 1996. Localization of the gustatory pathway in the human midbrain. *Neurosci Lett* 218:198-200.
- Shu C-H, Hummel T, Lee P-L, Chiu C-H, Lin S-H, Yuan B-C. 2009. The proportion of self-rated olfactory dysfunction does not change across the life span. *Am. J. Rhinol. Allergy* 23: 413–416.
- Singh PB, Iannilli E, Hummel T. 2011. Segregation of gustatory cortex in response to salt and umami taste studied through event-related potentials. *Neuroreport* 22: 299–303.
- Skrandies W, Zschieschang R. 2015. Olfactory and gustatory functions and its relation to body weight. *Physiol. Behav.* 142: 1–4.
- Small DM. 2010. Taste representation in the human insula. *Brain Struct. Funct.* 214: 551–561.
- Small DM, Jones-Gotman M, Zatorre RJ, Petrides M, Evans AC. 1997. A role for the right anterior temporal lobe in taste quality recognition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17: 5136–5142.
- Small DM, Zald DH, Jones-Gotman M, Zatorre RJ, Pardo JV, Frey S, Petrides M. 1999. Human cortical gustatory areas: a review of functional neuroimaging data. *Neuroreport* 10: 7–14.
- Smith DV, Li CS, Davis BJ. 1998. Excitatory and inhibitory modulation of taste responses in the hamster brainstem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 450–456.
- Smith DV, Margolskee RF. 2001. Making sense of taste. *Sci. Am.* 284: 32–39.
- Snyder DJ, Bartoshuk LM. 2009. Epidemiological studies of taste function: Discussion and perspectives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170: 574–580.
- Sorokowska A, Schriever VA, Gudziol V, Hummel C, Hähner A, Iannilli E, Sinding C, Aziz M, Seo HS, Negoias S, Hummel T. 2014. Changes of olfactory abilities in relation to age: odor identification in

more than 1400 people aged 4 to 80 years. Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.

Stevens JC. 1996. Detection of tastes in mixture with other tastes: issues of masking and aging. Chem. Senses 21: 211–221.

Stevens JC, Cain WS, Demarque A, Ruthruff AM. 1991. On the discrimination of missing ingredients: aging and salt flavor. Appetite 16: 129–140.

Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, Ishimaru Y, Misaka T. 2013. Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). J. Biol. Chem. 288: 36863–36877.

Trepel M. 2012. Neuroanatomie: Struktur und Funktion : [mit dem Plus im Web - Zugangscode im Buch]. München: Urban & Fischer in Elsevier.

Uesaka Y, Nose H, Ida M, Takagi A. 1998. The pathway of gustatory fibers of the human ascends ipsilaterally in the pons. Neurology 50: 827–828.

Veldhuizen MG, Albrecht J, Zelano C, Boesveldt S, Breslin P, Lundstrom JN. 2011. Identification of Human Gustatory Cortex by Activation Likelihood Estimation. Hum. Brain Mapp. 32: 2256–2266.

Wakita M, Kobayakawa T, Saito S, Sakai N, Hiai Y, Hirai T, Yamashita Y, Hasegawa K, Matsunaga K, Ogawa H. 2009. Handedness: dependent asymmetrical location of the human primary gustatory area, area G. Neuroreport 20: 450–455.

Westenhoefer J. 2005. Age and gender dependent profile of food choice. Forum Nutr. 44–51.

Winkler S, Garg AK, Mekayarajjanonth T, Bakaeen LG, Khan E. 1999. Depressed taste and smell in geriatric patients. J. Am. Dent. Assoc. 130: 1759–1765.

Wysocki CJ, Gilbert AN. 1989. National Geographic Smell Survey. Effects of age are heterogenous. Ann. N. Y. Acad. Sci. 561: 12–28.

Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJP. 2009. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. Cell 139: 234–244.