© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/

Z. Säugetierkunde 55 (1990) 407–412
© 1990 Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin
ISSN 0044-3468

# Eine verhaltensphysiologische Untersuchung zur Ermittlung olfaktorischer Schwellenwerte bei männlichen Ratten

Von R. Apfelbach, Susanne Schütz und B. Slotnick

*Zoologisches Institut, Universität Tübingen, FRG* und *Department of Psychology, The American University, Washington, USA*

*Eingang des Ms. 4. 12. 1989*
*Annahme des Ms. 30. 5. 1990*

## Abstract

*A behavioural study for olfactory threshold detection in male rats*

Investigated were the olfactory thresholds of subadult and adult male laboratory rats (Wistar) towards the odor ethyl acetate. Thresholds were established with a computerized olfactometer which allows continuous odor presentations. The olfactometer provided dilutions of the ethyl acetate vapor varying from $10^{-1}$ to $10^{-9}$ vol% of the odor. Prior to the absolute threshold tests animals were trained to respond to the odor by being rewarded with water as positive reinforcement.

A significant difference in the olfactory thresholds between subadult ($7.3 \times 10^{-5}$ vol% ethyl acetate) and adult ($1.4 \times 10^{-5}$ vol%) males was found. This difference is linked to differences in the density of the sensory cells in the olfactory epithelium between the two age groups.

## Einleitung

Wie verschiedene Untersuchungen erkennen lassen, spielt bei Ratten der olfaktorische Sinn eine dominierende Rolle in vielen Verhaltensbereichen, so z. B. bei der Kommunikation oder der Nahrungssuche (Leon und Moltz 1972; Carr et al. 1979). Über die Leistungsfähigkeit ihres Geruchsorgans wie auch über die Mechanismen der Duftperzeption liegen dagegen nur vergleichsweise wenige Ergebnisse vor (Moulton 1960; Marshall und Moulton 1981). Die Kenntnis olfaktorischer Schwellenwerte ist aber eine wichtige Voraussetzung für weitergehende Fragestellungen wie beispielsweise die Klärung der Duftmolekül-Rezeptor-Interaktionen (Shirley et al. 1987). Mit der vorliegenden Untersuchung werden daher an unterschiedlich alten männlichen Laborratten die in Verhaltenstests ermittelten Schwellenwerte für den in der Geruchsforschung wiederholt verwendeten Duftstoff Ethylacetat ($C_4H_8O_2$) vorgestellt.

## Material und Methode

### Versuchstiere

Die olfaktorischen Schwellenwerte werden für 8 subadulte (Gruppe I) und 9 adulte (Gruppe II) männliche Laborratten (Wistar) beschrieben. Das genaue Alter der Tiere zu Versuchsbeginn und -ende zeigt die Tabelle. Die Haltung der Tiere erfolgte jeweils in Standardkäfigen zu Gruppen von je zwei oder drei Tieren; Futterpellets standen ad lib., Wasser in genau bemessenen Mengen zur Verfügung.

### Versuchsanlage

Das von Slotnick (Slotnick und Schoonover 1984) entwickelte Olfaktometer (Abb. 1) eignet sich zur Ermittlung von olfaktorischen Schwellenwerten und zur Überprüfung von Diskriminationsleistungen bei Ratten. Es ermöglicht kontinuierliche, variable Duftstoffexpositionen bis in Grenz-

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement: 0044-3468/90/5506-0407 $ 02.50/0

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/



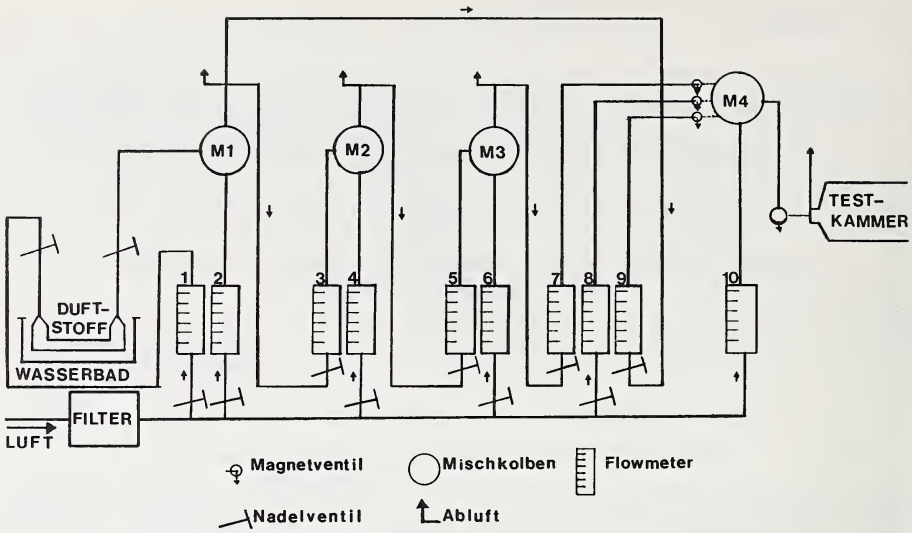


*Abb. 1.* Schematische Darstellung des Olfaktometers. Der Duftstoff kann mit gereinigter Luft in Mischkolben (M1–M4) variabel zwischen $10^{-1}$ Vol.-% und $10^{-9}$ Vol.-% verdünnt werden, bevor er dem Tier zur Prüfung angeboten wird

bereiche von $10^{-9}$ Vol.-% eines Duftstoffes und arbeitet nach dem Prinzip einer operanten Konditionierung: Im Sinne der Aufgabenstellung richtige Verhaltensantworten werden belohnt.

Der den Duftstoff enthaltende Behälter befindet sich in einem Wasserbad, wodurch die Temperatur der Luft, die über den Duftstoff strömt, etwas unterhalb der Umgebungstemperatur gehalten wird. Temperaturschwankungen und Kondensationsprozesse im Leitungssystem der Anlage werden damit verhindert. Die Bereitstellung der verschiedenen Duftkonzentrationen erfolgt in mehreren Schritten. Gefilterte Druckluft wird über den Duftstoff geleitet. Der Luftstrom läßt sich mit einem vor einem geeichten Meßrohr liegenden Nadelventil regulieren. Die mit dem Duftstoff zu über 95 % gesättigte Luft (Dravnieks 1975) wird in einem ersten Mischkolben (M1) mit einer definierten Menge gereinigter Luft vermischt und über Mischkolben M4 zur Riechvorrichtung der Testkammer geleitet, in der sich das Versuchstier befindet. Ob in die Riechvorrichtung Luft oder Duftstoff geleitet wird, wird mittels computergesteuerter Magnetventile bestimmt. Mit Hilfe des ersten Mischkolbens können Duftstoffkonzentrationen von $10^{-3}$ Vol.-% erreicht werden. Für geringere Konzentrationen (bis zu $10^{-9}$ Vol.-%) muß der Duft in nachgeschalteten Mischkolben (M2–M3) mit gereinigter Luft weiter verdünnt werden. Für eine präzise Einhaltung der eingestellten Durchströmungsraten und damit der Duftkonzentrationen ist eine Absicherung gegen Druckschwankungen im Leitungssystem erforderlich. Weiterhin müssen die Durchströmungsraten an der Riechvorrichtung konstant gehalten werden, damit das Tier keine Diskrimination aufgrund unterschiedlicher Durchflußraten vornehmen kann.

Die Testkammer besteht aus einem 27,5 × 10 cm großen Plexiglaszylinder. Das eine Ende ist durch ein Drahtgitter verschlossen, am anderen befindet sich die aus Glas gefertigte Riechvorrichtung. Diese besteht aus einem senkrechten Tubus, durch den der ankommende Duft-/Luftstrom an der Testkammer so vorbeigeleitet wird, daß kein Duft in die Testkammer gelangt. Zusätzlich wird das Gemisch über ein Abluftsystem abgesogen. Eine seitliche Öffnung am Glastubus stellt die Verbindung zur Testkammer her. Um die vorbeiströmende Duft-/Luftmischung zu prüfen, muß die Ratte ihre Nase durch diese Öffnung stecken. Sie durchbricht dabei den Strahl einer seitlich angebrachten Photozelle und startet damit einen Versuchsablauf.

## Versuchsablauf und Auswertung

Wird der Lichtstrahl durchbrochen, lenkt das unmittelbar vor der Riechvorrichtung befindliche Magnetventil den zunächst reinen Luftstrom für eine zufallsgemäß variable Zeit von 0,8–2,0 sec an der Riechvorrichtung vorbei zum Abzug. Gleichzeitig wird das Luft- oder ein Duft-Magnetventil aktiviert. Wird ein Duft-Ventil aktiviert, können sich Duft und Luft in einem vorgegebenen Verhältnis mischen. Diese Mischung wird dann für 2,0 sec über die Riechvorrichtung angeboten. Das Tier muß mindestens 0,2 sec während dieser Darbietungszeit die Duft-/Luftmischung prüfen, bevor

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/



es – nur bei Duft – an der seitlich angebrachten Belohnungsstelle für wiederum 2,0 sec als Belohnung Wasser lecken kann. Als Richtigwahl wird das Wasserlecken nach Duftpräsentation gewertet. Die Belohnungsgabe unterbleibt nach Luftpräsentation, auch wenn die Ratte an der Belohnungsstelle leckt (Falschwahl). Anschließend, nach einer Wartezeit von 2,0 sec, kann das Tier einen neuen Versuchsablauf starten. Eine Versuchssitzung besteht aus jeweils 100 Versuchsabläufen, die unmittelbar nacheinander auszuführen sind.

Alle Verhaltensantworten und Zeitabläufe (Prüfdauer bei Luft und Duft, % Richtig- und Falschwahlen) werden computergesteuert registriert, im Sinne der Aufgabenstellung bewertet und unmittelbar nach Versuchsende über einen Drucker ausgegeben. Als Riechschwelle wurde die Duftstoffkonzentration gewertet, bei der zumindest 75 % aller Verhaltensreaktionen während einer Versuchssitzung im Sinne der Aufgabenstellung richtig waren. War der Schwellenwert unterschritten, gingen die Tiere zu Zufallsreaktionen über (Abb. 3). Statistische Absicherungen erfolgten mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Bevor mit den Schwellenwertbestimmungen begonnen wurde, wurden alle Tiere in die Anlage eingewöhnt und mit Hilfe vorgeschalteter Lernprogramme schrittweise mit der Aufgabe vertraut gemacht.

## Ergebnisse

Innerhalb von nur zwei bis drei Versuchssitzungen zu je 100 Versuchsabläufen beherrschten alle Tiere die Diskrimination zwischen Luft und Duft mit über 96%iger Sicherheit bei einer Anfangskonzentration von $10^{-1}$ Vol.-% Ethylacetat. Altersabhängige Unterschiede in bezug auf das Erlernen der operanten Aufgabe bestanden nicht. Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Dauer einer Versuchssitzung. Die Tiere der Gruppe I benötigten mit durchschnittlich 28 min pro 100 Versuchsabläufe signifikant mehr Zeit als die der Gruppe II (23 min; $p < 0{,}05$).

Die Prüfdauer bei Luftpräsentation war bei beiden Altersgruppen ähnlich und lag deutlich über einer Sekunde. Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Prüfdauer der Duftmischungen. Bei der Anfangskonzentration von $10^{-1}$ Vol.-% Ethylacetat betrug die Prüfdauer bei Gruppe I durchschnittlich 0,38 sec, bei Gruppe II durchschnittlich 0,57 sec ($p < 0{,}035$). Mit abnehmender Duftstoffkonzentration verlängerte sich die Prüfdauer bei allen Tieren sowohl bei Duft- wie auch bei Luftpräsentation; nach Unterschreiten der individuellen Schwellenwerte entsprach die Prüfdauer bei Duftpräsentation weitgehend

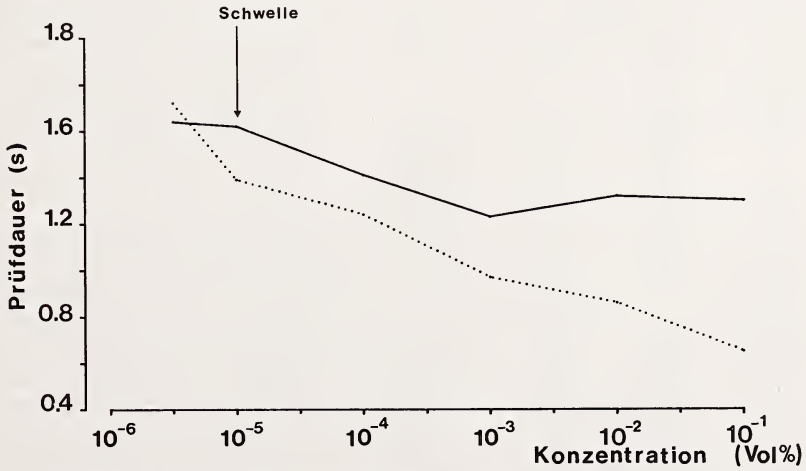


*Abb. 2.* Prüfdauer in Abhängigkeit von der Duftstoffkonzentration. Mit abnehmender Duftstoffkonzentration verlängert sich die Prüfzeit bei Duftpräsentation (gepunktete Linie), aber auch bei Luftpräsentation (durchgezogene Linie), was als Ausdruck eines zunehmenden Schwierigkeitsgrades angesehen wird

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/



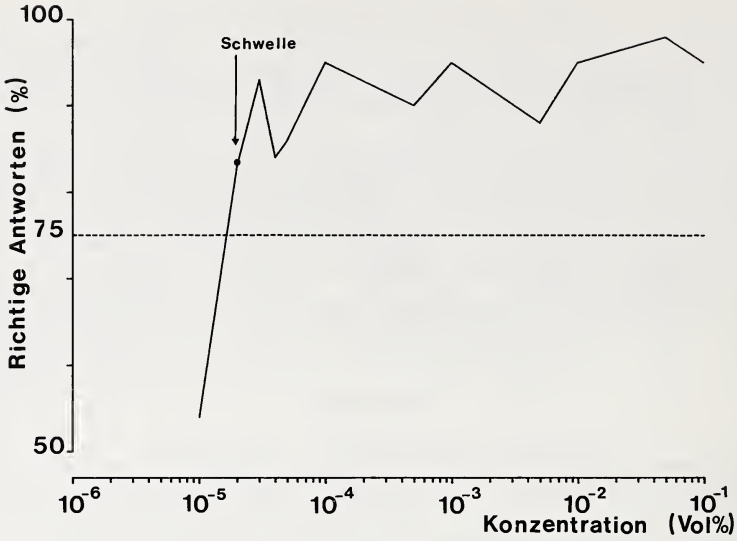


*Abb. 3.* Darstellung einer Schwellenbestimmung. Bei hohen Konzentrationen wird die Aufgabe mit großer Sicherheit gelöst. Kann das Tier den Duft nicht mehr von reiner Luft unterscheiden, liegen die richtigen Reaktionen im Bereich der Zufallsverteilung

der bei reiner Luftpräsentation. Einen typischen Kurvenverlauf für diese Verhaltensreaktion zeigt Abb. 2.

Bei Duftkonzentrationen zwischen $10^{-1}$ und $10^{-4}$ Vol.-% erfolgte die Diskrimination zwischen Luft und Duftstoff bei allen Tieren mit hoher Sicherheit. Mit weiter abnehmender Duftstoffkonzentration erhöhte sich die Fehlerquote zunächst leicht, um dann, nach Unterschreiten des Schwellenwertes, bis auf 50 % (Zufallswahl) anzusteigen. In Abb. 3 ist der typische Verlauf für eine Riechschwellenkurve dargestellt. Die Tabelle zeigt die individuellen Schwellenwerte aller Versuchstiere, wobei das beste Ergebnis jedes einzelnen Tieres dargestellt ist. Innerhalb von Gruppe I beträgt der durchschnittliche Schwellenwert $7{,}3 \times 10^{-5}$ Vol.-% Ethylacetat. Auffallend ist jedoch die vergleichsweise große Schwankungsbreite der Schwellenwerte innerhalb dieser Altersgruppe. Die Schwellenwerte für die Tiere der Gruppe II sind dagegen recht einheitlich und betragen durchschnittlich $1{,}4 \times 10^{-5}$ Vol.-%. Der mit $7 \times 10^{-6}$ Vol.-% Ethylacetat insgesamt niedrigste Schwellenwert wurde von einem Männchen dieser Altersgruppe erreicht.

Damit ergibt sich bei den männli-

**Alter (Tage) der Tiere bei Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der Schwellenermittlung**

| Tier No. | Alter bei Beginn | Alter bei Ende | Schwelle (Vol. %) |
|---|---|---|---|
| Gruppe I | | | |
| 1 | 50 | 71 | $2 \times 10^{-4}$ |
| 2 | 50 | 75 | $1 \times 10^{-4}$ |
| 3 | 50 | 96 | $7 \times 10^{-5}$ |
| 4 | 50 | 89 | $6 \times 10^{-5}$ |
| 5 | 50 | 94 | $5 \times 10^{-5}$ |
| 6 | 50 | 113 | $5 \times 10^{-5}$ |
| 7 | 50 | 127 | $3 \times 10^{-5}$ |
| 8 | 50 | 127 | $2 \times 10^{-5}$ |
| | | Durchschnitt: | $7{,}3 \times 10^{-5}$ |
| Gruppe II | | | |
| 9 | 140 | 202 | $3 \times 10^{-5}$ |
| 10 | 140 | 202 | $2 \times 10^{-5}$ |
| 11 | 360 | 407 | $2 \times 10^{-5}$ |
| 12 | 140 | 172 | $1 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 140 | 172 | $1 \times 10^{-5}$ |
| 14 | 360 | 411 | $1 \times 10^{-5}$ |
| 15 | 320 | 357 | $9 \times 10^{-6}$ |
| 16 | 360 | 429 | $9 \times 10^{-6}$ |
| 17 | 140 | 206 | $7 \times 10^{-6}$ |
| | | Durchschnitt: | $1{,}4 \times 10^{-5}$ |

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/



chen Ratten trotz der vorhandenen interindividuellen Schwankungen ein Unterschied zwischen beiden Altersgruppen. Die Riechschwelle subadulter Tiere liegt mit $p < 0{,}002$ signifikant über der adulter Tiere.

## Diskussion

Ob ein Stoff olfaktorisch wahrgenommen wird, hängt sowohl von seinen chemischen/physikalischen Eigenschaften (Amoore et al. 1964) als auch von den morphologischen und biochemischen Eigentümlichkeiten des Riechepithels und seiner Rezeptoren ab (Shirley et al. 1987). Neben der Suche nach den eine Duftempfindung auslösenden Faktoren steht die Frage nach der Empfindlichkeit des olfaktorischen Systems im Mittelpunkt verschiedener Arbeiten. Als Maß der Empfindlichkeit wird dabei üblicherweise die Riechschwelle gewertet, die je nach Duftstoff von Art zu Art beträchtlich variieren kann, z. B. zwischen Mensch und Hund bzw. Mensch und Ratte um den Faktor $10^6$ (Neuhaus 1957; Laing 1975). Als mögliche Ursache für inter- und auch intraspezifische Unterschiede in der Riechschwelle wird u. a. die unterschiedliche Anzahl der Rezeptorzellen in Betracht gezogen.

Quantitativ morphometrische Untersuchungen am Riechepithel heranwachsender Laborratten lassen postnatale Reifungsprozesse an dieser Struktur erkennen. Dies betrifft sowohl die Fläche des olfaktorischen Epithels als auch die Anzahl und Dichte der Riechsinneszellen. Bei neugeborenen männlichen Ratten beträgt die Fläche des gesamten olfaktorischen Epithels (Septum nasi und Conchae) auf jeder Seite etwa 15 $mm^2$ und steigt bis zum 25. Lebenstag (Entwöhnen der Jungtiere) auf 120 $mm^2$ an (Meisami 1989). Betrachtet man nur die mit größerer Genauigkeit zu vermessende septale Fläche, so nimmt diese von der Geburt bis zum 60. Lebenstag (Eintritt der Geschlechtsreife) von 12 $mm^2$ auf 74 $mm^2$ zu; bei noch älteren Tieren wurden mehr als 106 $mm^2$ gemessen. Während der gleichen Zeit steigt die Anzahl der Riechsinneszellen auf der septalen Fläche von ca. 400 000 bei Neugeborenen auf über $6 \times 10^6$ bei Adulttieren an (Russ 1989).

Ohne Frage ist die Anzahl der Rezeptorzellen entscheidend für die Sinnesleistung. Uns erscheint jedoch die Dichte der Rezeptorzellen ein maßgebender Faktor zu sein, denn mit zunehmender Dichte erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Duftmolekül-Rezeptor-Interaktion und senkt so die schwächste noch wahrnehmbare Duftkonzentration, die Schwellenkonzentration. Wie unsere Ergebnisse zeigen, haben 60 Tage alte Ratten mit 60 000–78 000 Riechsinneszellen/$mm^2$ Epitheloberfläche (Hinds und McNelly 1981; Russ 1989) trotz interindividueller Schwankungen eine höhere Riechschwelle ($7{,}3 \times 10^{-5}$ Vol.-%) als Adulttiere ($1{,}4 \times 10^{-5}$ Vol.-%), für die 80 000–85 000 Riechsinneszellen/$mm^2$ angegeben werden (Hinds und McNelly 1981; Russ 1989).

Für die Bewertung der Leistungsfähigkeit eines Sinnesorgans muß neben der Anzahl bzw. der Dichte der Rezeptorzellen auch die Konvergenz zwischen den Sinneszellen und den nachgeschalteten Relayneuronen berücksichtigt werden (Drongelen et al. 1978). Verschiebt sich die Konvergenz zugunsten der Sinneszellen, ist mit einer zunehmenden Empfindlichkeit der Sinneswahrnehmung zu rechnen. Solche Konvergenzstudien im olfaktorischen System liegen für Ratten bisher nur bis zum 25. Lebenstag vor (Meisami 1989). Das Verhältnis zwischen den Riechsinneszellen und den nachgeschalteten Relayneuronen (Mitralzellen) im Bulbus olfactorius ändert sich von der Geburt bis zum 25. Lebenstag von 25 : 1 ($10^6$ Rezeptorzellen und $4 \times 10^4$ Mitralzellen) auf 250 : 1. Eine verhaltensphysiologische Bestätigung finden diese Konvergenz-Überlegungen zur Empfindlichkeit des olfaktorischen Systems in den Arbeiten von Alberts und May (1980). Neugeborene Ratten können nach den Untersuchungen dieser Autoren sowohl natürliche (Urin) als auch künstliche Düfte (Amylacetat) riechen, allerdings nur bei hohen Konzentrationen. 15–17 Tage alte Tiere reagieren dagegen bereits auf diese Düfte, auch wenn sie in einer $10^3$fach verdünnten Konzentration angeboten werden.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/



Ob neben der zunehmenden Dichte bzw. der zunehmenden Konvergenz auch andere Faktoren die Sinnesleistung beeinflussen, beispielsweise alters- oder hormonabhängige Unterschiede in der Rezeptorempfindlichkeit, bedarf weiterer Überprüfung.

## Zusammenfassung

An unterschiedlich alten männlichen Laborratten (Wistar) wurde die Riechempfindlichkeit gegenüber dem Duftstoff Ethylacetat im Verhaltenstest ermittelt. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines computerisierten Olfaktometers durchgeführt, das kontinuierliche Duftreizdarbietungen von $10^{-1}$ Vol.-% bis zu einer Verdünnungsstufe von $10^{-9}$ Vol.-% des Duftstoffes erlaubt. Die Tiere werden dabei mittels einer operanten Konditionierung mit der Aufgabe vertraut gemacht und bei Richtigwahl belohnt.

Zwischen den subadulten ($7{,}3 \times 10^{-5}$ Vol.-% Ethylacetat) und adulten ($1{,}4 \times 10^{-5}$ Vol.-%) Ratten zeigten sich signifikante Unterschiede im Schwellenwert. Diese alters-/entwicklungsabhängigen Unterschiede werden mit der unterschiedlichen Sinneszelldichte im Riechepithel in Verbindung gebracht.

## Literatur

Alberts, J. R.; May, B. (1980): Ontogeny of olfaction: development of the rats' sensitivity to urine and amyl acetate odors. Physiol. Behav. **24**, 965–970.

Amoore, J. E.; Johnston, J. W. jr.; Rubin, M. (1964): Die Stereochemie des Geruchs. Umschau **19**, 600–604.

Carr, W. J.; Hirsch, J. T.; Campellone, B. E.; Marasco, E. (1979): Some determinants of a natural food aversion in Norway rats. J. comp. Physiol. Psychol. **93**, 899–906.

Dravnieks, A. (1975): Instrumental aspects of olfactometry. In: Methods in Olfactory Research. Ed. by D. G. Moulton, and A. Turk and J. W. Johnston. New York: Academic Press. 1–61.

Drongelen, W.; Holley, A.; Doving, K. B. (1978): Convergence in the olfactory system. Quantitative aspects of odor sensitivity. J. theor. Biol. **71**, 39–48.

Hinds, J. W.; McNelly, N. A. (1981): Aging in the rat olfactory system: Correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb. J. comp. Neurol. **203**, 441–453.

Laing, D. G. (1975): A comparative study of the olfactory sensitivity of humans and rats. Chem. Senses Flavor **1**, 257–269.

Leon, M.; Moltz, H. (1972): The development of the pheromonal bond in the albino rat. Physiol. Behav. **8**, 683–686.

Marshall, D. A.; Moulton, D. G. (1981): Olfactory sensitivity to α-ionone in humans and dogs. Chem. Senses **6**, 53–61.

Meisami, E. (1989): A proposed relationship between increases in the number of olfactory receptor neurons, convergence ratio and sensitivity in the developing rat. Dev. Brain Res. **46**, 9–19.

Moulton, D. G. (1960): Studies in olfactory acuity III. Relative detectability of n-aliphatic acetates by the rat. Q. J. Exp. Psychol. **12**, 203–213.

Neuhaus, W. (1957): Über das Verhältnis der Riechschärfe zur Zahl der Riechreceptoren. Verh. Dtsch. Zool. **25**, 385–392.

Russ, D. (1989): Die postnatale Entwicklung der Regio olfactoria der Laborratte. Dipl.-Arbeit, Universität Tübingen.

Shirley, E.; Polak, E. H.; Mathier, R. A.; Dood, G. H. (1987): The effect of concanavalin A on the rat electro-olfactogram. Biochem. J. **245**, 175–184.

Slotnick, B.; Schoonover, F. W. (1984): Olfactory thresholds in unilaterally bulbectomized rats. Chem. Senses **9**, 325–340.

*Anschriften der Verfasser:* Prof. Dr. Raimund Apfelbach und Dipl.-Biol. Susanne Schütz, Zoologisches Institut, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, W-7400 Tübingen 1, FRG; Prof. Dr. Burton Slotnick, Department of Psychology, The American University, 4400 Massachusetts Ave, N.W., Washington, D.C. 20016, USA

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mammalian Biology (früher Zeitschrift für Säugetierkunde)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: 55

Autor(en)/Author(s): Apfelbach Raimund, Schütz Susanne, Slotnick Burton

Artikel/Article: Eine verhaltensphysiologische Untersuchung zur Ermittlung olfaktorischer Schwellenwerte bei männlichen Ratten 407-412