

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA KLUN

**POVEZAVA MED GENETSKO – FIZIOLOŠKIMI LASTNOSTMI  
OSEBE IN PREFERENCO OSEBNEGA VONJA TER VONJA  
IZBRANIH SPOJIN**

CORELATION BETWEEN GENETIC – PHYSIOLOGICAL  
CHARACTERSTIC OF A PERSON AND BODY ODOUR PREFERENCE  
AND ODOUR OF SELECTED COMPOUNDS

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo. Tipizacijo HLA so opravili na Centru za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Zahvaljujem se vsem mojim prijateljem in znancem, ki so sodelovali pri raziskavi kot prostovoljci.

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorju doc. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. za izredno dobro sodelovanje in usmerjanje pri diplomskem delu. Za hitro delo bi se rada zahvalila vsem zaposlenim na Centru za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Posebno zahvalo za pomoč pri eksperimentalnem delu si zasluži asist. dr. Damjan Janeš, mag. farm..

Za pomoč pri izdelavi diplomskega dela se zahvaljujem moji družini, ki me je potrpežljivo podpirala tudi tekom celotnega študija. Za podporo hvala vsem mojim prijateljem, ki vedno verjamejo vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm..

# **VSEBINA**

<b><u>POVZETEK</u></b>	<b>5</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b>6</b>
<b><u>SEZNAM OKRAJŠAV</u></b>	<b>7</b>
<b><u>1 UVOD</u></b>	<b>8</b>
1.1 KOMPLEKS TKIVNE SKLADNOSTI	8
1.2 POVEZAVA MED MHC TER IZBIRO PARITVENEGA PARTNERJA	10
1.3 POVEZAVA MED TIPOM HLA IN PREFERENCO VONJA PRI LJUDEH	11
1.4 RAZLIČNE HIPOTEZE VPLIVA TIPA MHC NA OSEBNI VONJ	12
1.5 MEHANIZEM ZAZNAVE OSEBNEGA VONJA V ODVISNOSTI OD MHC	14
1.6 KEMIJSKA SESTAVA OSEBNEGA VONJA	15
1.7 MOŠUSI	18
<b><u>2 NAMEN DELA</u></b>	<b>20</b>
<b><u>3 MATERIALI</u></b>	<b>21</b>
3.1 VZORČENJE OSEBNEGA VONJA	21
3.2 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDAROV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN	21
3.3 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV	22
<b><u>4 METODE</u></b>	<b>24</b>
4.1 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV	24
4.2 VZORČENJE TELESNEGA VONJA	24
4.3 SEANSA VOHANJA MAJIC	25
4.4 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDARDOV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN	26
4.5 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV	29

<b>4.6 POSTOPEK GENSKE TIPIZACIJE HLA</b>	<b>32</b>
<b>4.7 STATISTIČNE METODE</b>	<b>34</b>
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>36</b>
<hr/>	
<b>5.1 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV</b>	<b>36</b>
<b>5.2 SEANSA VOHANJA MAJIC</b>	<b>39</b>
<b>5.3 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDARDOV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN</b>	<b>42</b>
<b>5.4 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV</b>	<b>47</b>
<b>6 SKLEP</b>	<b>52</b>
<hr/>	
<b>7 LITERATURA</b>	<b>53</b>
<hr/>	
<b>8 PRILOGE</b>	<b>55</b>
<hr/>	

## **POVZETEK**

Znano je, da pri miših na izbor paritvenega partnerja vpliva kompleks tkivne skladnosti (MHC). Pokaže se, da se samica miši pari le s samcem, ki ima tip MHC čimbolj različen od njenega. Dokaz vpliva tipa MHC na izbor partnerja v živalskem svetu je pokazal potencialen vpliv človeških levkocitnih antigenov (HLA) na izbor partnerja pri ljudeh. Več študij je potrdilo hipotezo, da sta si osebi, z različnim tipom HLA po vonju bolj všeč, kot osebi s podobnim tipom HLA. Določene študije pa niso pokazale tovrstne povezave. Rezultati naših analiz so pokazali, da hipoteza deloma drži, vendar le kadar so ocenjevalci telesnega vonja ženske in ko primerjamo sorodnost samo na določenih lokusih HLA (HLA-A\* in HLA-DRB1\*). Rezultati kažejo vpliv tipa HLA tudi na preferenco vonja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin ter na preferenco vonja mošusov.

## **ABSTRACT**

It is known that mice breeding partner selection is influenced by the major histocompatibility complex (MHC). It has been proven that female mice prefer to mate with males, that have dissimilar MHC. The evidence of the MHC effect on mating selection in the animal world has shown potential effect human leukocyte antigens (HLA) on human partner selection. Most studies have confirmed the hypothesis, that two people with a different HLA like each other's odour more, than two people with a similar HLA, but some studies did not confirm this hypothesis. The results of our analysis have shown that the hypothesis is partially true, but only when comparing the kinship based on a certain HLA locus (HLA-A\* and HLA-DRB1\*) and only when females evaluated male odours. The results also show the HLA effect on a preference to different sweat compounds odours and a preference to different musk odours.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

DNK – deoksiribonukleinska kislina

EEG – elektroencefalogram

HLA– Human Leucocyte Antigens; človeški levkocitni antigeni

kat.št. – kataloška številka

kbp – kilo baznih parov

lat. – latinsko

MHC – Major Histocompatibility Complex; kompleks tkivne skladnosti

min – minuta

npr. – na primer

oz. – oziroma

PCR – Polimerase Chain Reaction; verižna reakcija s polimerazo

RS – Republika Slovenija

SSO – sekvenčno specifične oligonukleotidne probe

sp. – species

t.i. – tako imenovan

VNO – vomeronazalni organ

ZDA – Združene Države Amerike

# **1 UVOD**

Znano je, da pri miših na izbor paritvenega partnerja vpliva kompleks tkivne skladnosti (Major Histocompatibility Complex – MHC). Miši prepoznajo določen tip MHC glede na vonj urina potencialnega paritvenega partnerja. Pokaže se tendenca, da se samica miši pari s samcem, ki ima tip MHC čimbolj različen od njenega. Tako je v naravi preprečeno parjenje med sorodnimi mišmi in s tem zagotovljena genetska raznovrstnost (1).

Pri ljudeh so partnerske veze med sorodniki redke, saj so v različnih kulturah prisotni številni tabuji, ki prepovedujejo poroko s sorodnikom. Prav tako ljudje živimo s prepričanjem, da si partnerja, izberemo sami na podlagi zunanjega izgleda, karakternih značilnosti ter drugih lastnosti. Ne želimo si, da bi nas pri tem vodili naši geni, vendar se tudi pri človeški vrsti pokaže vpliv kompleksa tkivne skladnosti (Human Leucocyte Antigens - HLA) na izbor partnerja (1, 2, 3).

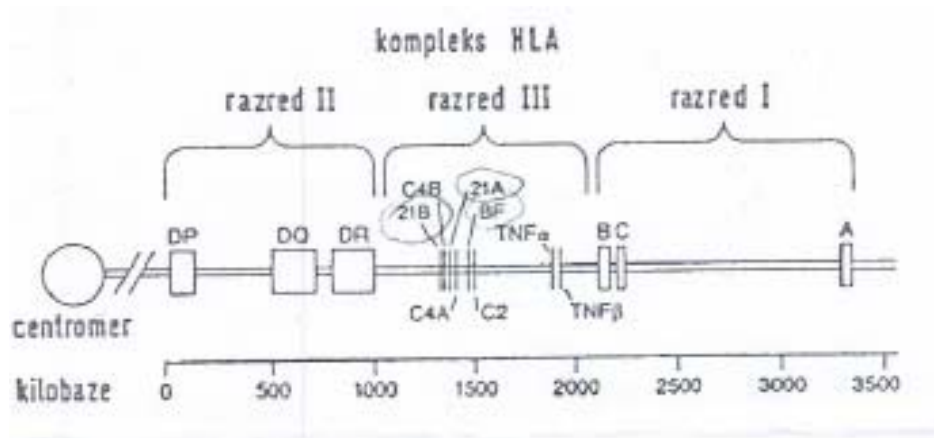
## **1.1 KOMPLEKS TKIVNE SKLADNOSTI**

Za večino antigenov je značilna homolognost med posamezniki iste vrste, torej so antigeni posameznikov enaki. Nasprotno se pri MHC pokaže velik polimorfizem znotraj vrste. Tako molekule MHC pri drugem nesorodnem posamezniku iste vrste povzročijo imunski odziv, ki se pri transplantaciji organov pokaže kot zavrnitev organa (4). Molekule MHC so pomembne tudi pri uravnavanju imunskega sistema. Osnovna naloga imunskega sistema je razločevanje med lastnim in tujim, kar doseže s pomočjo molekul MHC. Limfociti T z receptorjem CD4 spoznajo antigene v povezavi z molekulami MHC razreda II, z receptorjem CD8 pa v povezavi z molekulami MHC razreda I. V primeru omejenega števila molekul MHC v populaciji, bi lahko mikrobi mutirali svoje antigene, da jih molekule MHC ne bi vezale. Nezmožnost vezave molekul MHC na antigen mikroba bi preprečila delovanje limfocitov T in s tem specifičen imunski odgovor. Pri tako različnih molekulah MHC je torej manj verjetno, da bi se pojavil mikrobní peptid, ki se ne bo vezal na nobeno izmed molekul MHC (4).



Kadar govorimo o MHC pri človeku, govorimo o molekulah HLA. Te so na površini večine človeških celic z jedri. Genetski zapis za molekule HLA je na krajšem kraku šestega para kromosomov. Molekule HLA in kodirajoče gene razvrstimo v tri razrede: razred I, razred II in razred III (slika 1).

- Molekule razreda I vključujejo podrazrede HLA-A, HLA-B in HLA-C. Najdemo jih na večini celic, razen na eritrocitih, spermijih, trofoblastih in nekaterih tumorskih celicah.
- Molekule razreda II vključujejo podrazrede HLA-DR, HLA-DQ in HLA-DP. Najdemo jih na monocitih, makrofagih, limfocitih B, aktiviranih limfocitih T, endotelijskih celicah, dendritnih celicah in celicah Langerhansovih otočkov.
- Molekule razreda III vključujejo komponenti C2 in C4 klasične poti komplementa, dejavnik B alternativne poti komplementa, dejavnik tumorske nekroze in limfotoksin. Molekule razreda III ne delujejo kot transplantacijski antigeni, prav tako ne predstavljajo antigenov limfocitom T (4).



**Slika 1:** Položaj genov posameznih razredov HLA ter lokusov na krajšem kraku kromosoma 6 pri človeku (54).

Kompleks genov HLA je najbolj polimorfen genski kompleks. Sestavljajo ga lokus A, lokus B, lokus C in lokusi D. Teoretično je za vsak lokus možnih  $\frac{1}{2}(n^2-n+2)$  različnih fenotipov, torej jih je teoretično lahko približno 40 milijonov (4).

Kako pomembne so molekule HLA v delovanju imunskega sistema je pokazala tudi študija, da je alel na genu HLA-Bw53 odgovoren za odpornost na malarijo pri ljudeh. Kar 40% Nigerijcev je homo- ali heterozigotov za ta alel. V predelih sveta, kjer malarije ni, pa je prisotnost tega alela redka (5).

## 1.2 POVEZAVA MED MHC TER IZBIRO PARITVENEGA PARTNERJA

Značilnost v živalskem svetu je neverbalno sporočanje informacij, tudi s pomočjo vonja. Živali si tako z vonjem sporočajo spol, vrsto, starostno obdobje, pripadnost določeni skupini, obdobje razmnoževalnega cikla, socialni položaj, stopnjo stresa (strah) in individualno identiteto. Že od leta 1976 je znano, da pri miših (*Mus musculus domesticus*) obstaja povezava med tipom MHC in izbiro partnerja (3). Tako samci kot samice si partnerja med paritvenim obdobjem izbirajo glede na vonj. Izkazalo se je, da je vonj v povezavi z molekulami MHC. Natančen mehanizem povezave med molekulami MHC ter osebnim vonjem in vonjem urina še ni znan, obstaja več hipotez, ki jih bomo razložili v nadaljevanju (glej poglavje 1.4). Raziskave so pokazale, da miši izberejo paritvenega partnerja, ki ima čimbolj različen tip MHC (1). Nadaljnjo raziskave pokažejo t.i. Bruce-ov efekt; breja samica spontano splavi, če samo zazna vonj samčka z bolj različnim tipom MHC v primerjavi s samčkom, ki jo je oplodil (5). Vemo, da je skladnost v molekulah MHC merilo stopnje sorodnosti, pomembno vlogo pa ima tudi pri delovanju imunskega sistema. Tako je preprečeno parjenje med sorodnimi mišmi, s čimer je tudi zagotovljeno, da so mladiči genetsko bolj raznoliki. Genetska raznolikost populacije je med drugim pomembna za uspešen boj proti patogenim organizmom (1).

V paritvenem obdobju torej samica išče samca s čimbolj različnim tipom MHC v želji, da bo skotila mladiče, ki bodo uspešni v procesu naravne selekcije. Nasprotno pa se pokaže pri samicah miši, ki so breje. Značilnost samic je vzgoja mladičev v skupinah, po več sorodnih samic skupaj. Tako breja samica išče miši, ki so ji glede na molekule MHC čimbolj podobne (5).

Vpliv MHC na izbor partnerja ni omejen le na glodalce. Pokazalo se je, da si paritvenega partnerja glede na molekule MHC izbirajo tudi ribe, kuščarji, ptiči in tudi ljudje. Primer študije pokaže, da samice reda zet (red morskih in sladkovodnih rib, lat. *Thoracostei*) z izborom samcev tako optimizirajo MHC mladičev. Ne izberejo samca s podobnim ali

različnim, ampak z določenim tipom MHC, ki naj bi omogočal optimalen tip MHC mladičev (3). Opisan je tudi primer kolonije planktonskih ličink kozolnjaka, *Botryllus schlosseri*. Te težijo k iskanju drugih kolonij ličink s čimbolj podobnim MHC. Dve koloniji s podobnim MHC se lahko združita v večjo kolonijo, ki je v boju z naravno selekcijo uspešnejša (5).

Sposobnost razlikovanja med različnimi tipi MHC ni omejena le na osebkke iste vrste. Miši in podgane iz vonja urina ločijo različne tipe HLA ljudi. Prav tako ljudje zaznajo razlike v vonju urina dveh miši, ki se razlikujeta le v molekulah MHC (1).

### 1.3 POVEZAVA MED TIPOM HLA IN PREFERENCO VONJA PRI LJUDEH

Številne raziskave vpliva MHC na izbor partnerja v živalskem svetu so povečale zanimanje za vpliv HLA na izbor partnerja pri ljudeh. Sledile so raziskave v Evropi, Ameriki in Aziji.

Več raziskav je potrdilo hipotezo, da sta si dve osebi z različnim tipom HLA po vonju bolj všeč, kot osebi s podobnim tipom HLA (1, 2, 3).

Študija, ki so jo izvedli na populaciji Hutterit, pa je to hipotezo ovrgla. Poudariti je treba, da je populacija Hutterit zelo izolirala populacija. Gre za skupino ljudi anabaptistične vere, ki se je leta 1528 oblikovala v Tirolskih Alpah. Okoli leta 1870 je bila skupina zaradi pregona prisiljena migrirati v Južno Dakoto, v ZDA. Značilnost diaspore Hutterit so zakonske zveze znotraj populacije same. Način življenja populacije tako onemogoča razvoj genetske raznolikosti (6, 7).

Podobno ovzre hipotezo tudi študija, ki zajema vzorec poročenih japonskih parov. Japonci se iz kulturnih razlogov poročajo s sorodniki, najpogosteje s sorodniki v prvem kolenu. Zelo pogosti so tudi dogovorjeni zakoni, takšnih je do 70%. Japonska kultura s tem preprečuje spontanost pri iskanju partnerja (8).

Dve raziskavi v Švici so izvedli drugače. Vzorec so bili študenti obeh spolov. Študenti so ocenjevali vonj oseb, ne da bi jih videli ali poznali njihov spol. Rezultati so hipotezo potrdili. Osebi je vonj druge osebe z različnim tipom HLA privlačnejši od vonja osebe s podobnim tipom HLA, ne glede na spol druge osebe (1, 2). Nasprotno je veljalo pri ženskah, ki so jemale oralne kontraceptive. Telo ženske, ki jemlje oralne kontraceptive, se obnaša podobno kot telo nosečnic (2). Kot smo že omenili, pri brejih miših opazimo, da miš išče bližino miši s podobnim tipom MHC. Enako se zgodi pri ženskah, ki jemljejo

kontracepcijske tablete. Te označijo vonj oseb s podobnim HLA bolj prijeten, kot vonj oseb z različnim HLA (1, 2).

Brazilsko študijo so bila naredili podobno kot raziskavo v Švici. Študija je hipotezo le delno potrdila. Pokazalo se je namreč, da hipoteza drži le, če je oseba, ki ugotavlja prijetnost vonja, ženskega spola. Za moške tako hipoteza ne drži, saj ne ločijo prijetnosti vonja druge osebe glede na njen tip HLA (3).

Vse več študij kaže tudi, da stopnja ujemanja v molekulah HLA ne vpliva le na izbor partnerja. Kadar sta si partnerja podobna v molekulah HLA, je večja možnost, da:

- ženska težje zanosi, tako po naravni poti, kot v primeru umetne oploditve,
- ženska težje ponovno zanosi,
- ženska spontano splavi in
- je teža novorojenčka nizka (1).

## 1.4 RAZLIČNE HIPOTEZE VPLIVA TIPA MHC NA OSEBNI VONJ

### *HIPOTEZA VPLIVA MOLEKULE MHC*

Hipoteza predlaga, da je vir vonja v urinu ali znoju molekula MHC ali njeni fragmenti (**slika 2a**). Hipoteza je privlačna zaradi njene preprostosti, vendar je nekaj dejstev, ki ji naprotujejo. Molekule MHC so beljakovine in niso hlapne, medtem ko so snovi, ki jih zaznavamo v vonju, hlapne. Podgane razlikujejo med vonji urina, ki vsebuje različne MHC molekule razreda I, vendar ne zaznavajo vonja nespremenjenih molekul MHC razreda I, izoliranih iz urina. Podgane ne razlikujejo med vonji krvi miši z različnimi tipi MHC. Miš lahko loči različne vonje urina drugih miši z različnimi tipi MHC, tudi kadar iz urina odstranimo beljakovine z relativno molekulsko maso večjo od 10.000 (9).

### *HIPOTEZA VPLIVA PEPTIDOV*

Molekule MHC vežejo alelsko specifične peptide, katerih metaboliti dajejo vonj (**slika 2b**). Lastnosti mesta vezave antigena na molekuli MHC, kamor se veže peptid, so odvisne od posameznikovega alela na genu za MHC. Tako je vonj odvisen od specifičnosti posameznikovega alela. Podobno velja za feromone sesalcev, ki se prav tako vežejo na

transportne beljakovine in potujejo do žlez. Dokazano je, da se miši z različnimi tipi MHC razlikujejo po deležu različnih kislin prisotnih v urinu. Te bi lahko bile metaboliti peptidov, ki se vežejo na molekule MHC. Kratkoverižne alifatske kisline so tiste, ki pri sesalcih oddajajo seksualno privlačen vonj (9).

#### *HIPOTEZA VPLIVA MIKROFLORE*

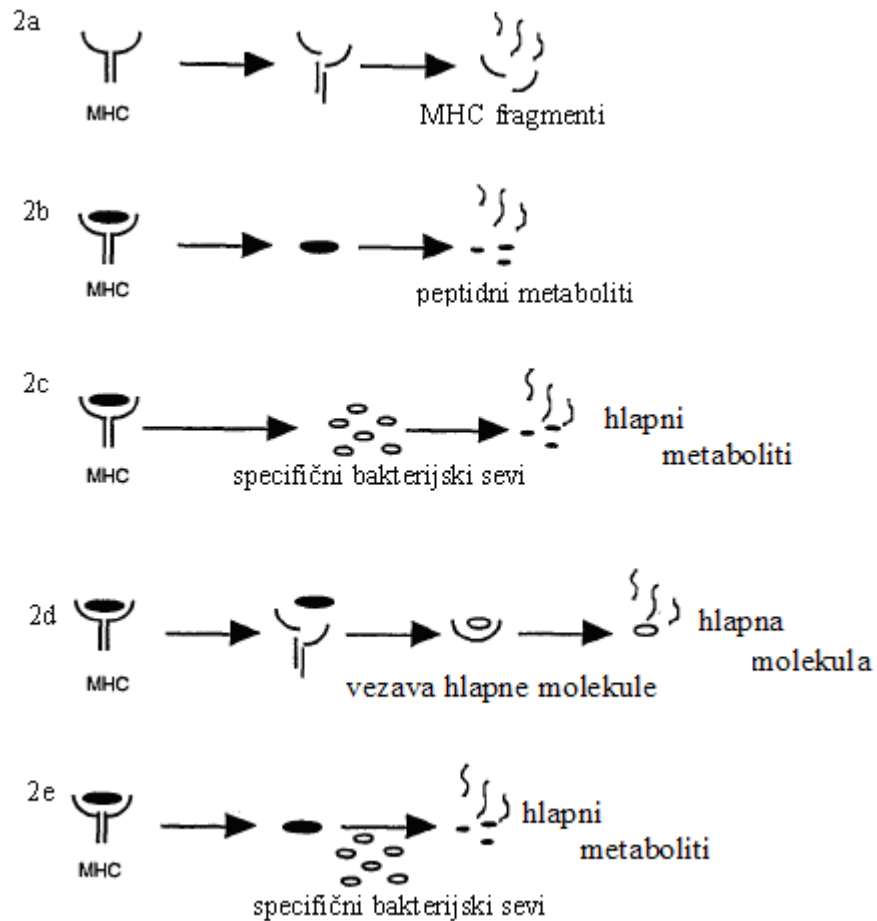
Na telesu miši najdemo  $10^{12}$  bakterij na koži,  $10^{10}$  v gobčku in  $10^{14}$  v prebavnem traktu. Bakterijska mikroflora je odvisna od genetskih lastnosti miši. Na vonj urina pri glodalcih vpliva mikroflora prepucijske žleze v bližini genitalnih odprtin. Dokazano je, da samec po odstranitvi prepucijskih žlez ni več privlačen za samico. Možno je, da geni za MHC vplivajo na bakterijsko mikrofloro (**slika 2c**). Študija je pokazala, da miši vzgojene v sterilnih pogojih nimajo značilnega vonja odvisnega od tipa MHC (9). Hipotezo spodbija študija, ki je dokazala, da lahko miši zaznajo tip MHC zarodka. Miš lahko iz urina breje miši 9 dni po oploditvi določi MHC tip zarodka, čeprav ta še nima razvitega imunskega sistema in bakterijske mikroflore (9, 5).

#### *HIPOTEZA VPLIVA PRENAŠALNIH MOLEKUL*

Molekule MHC naj bi se v telesu v procesu razgrajevanja pretvorile v molekule prenašalke vonja (**slika 2d**). Razgrajene molekule iz krvi v urin prenašajo edinstvene mešanice hlapnih aromatskih spojin, ki jih sintetizirajo črevesne bakterije. Problem te hipoteze je, da si težko predstavljamo preobrazbo hidrofilnega mesta vezave za peptide v hidrofobno mesto vezave za aromate (9).

#### *HIPOTEZA VPLIVA PEPTIDOV IN MIKROFLORE*

Hipoteza predlaga, da molekule MHC prenašajo edinstvene peptide do različnih žlez, kjer jih nato bakterije razgradijo do hlapnih metabolitov (**slika 2e**). Individualen vonj je tako odvisen od molekul MHC, ki specifično vežejo določene peptide. Veliko vlogo pri nastanku vonja ima tudi individualna mikroflora, ki je odvisna od tipa MHC. Hipoteza potrjuje tudi idejo, da so za vonj odgovorne kisline v urinu, saj bakterije sintetizirajo kisle metabolite (9).

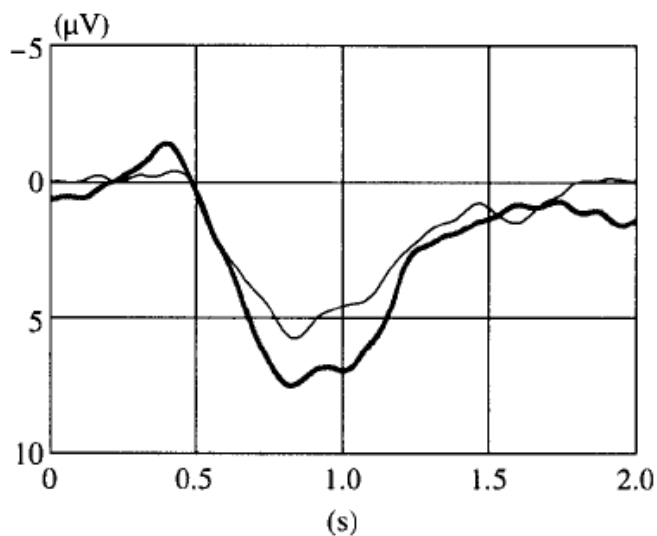


**Slika 2a-2e:** Shematski prikaz hipotez vpliva MHC na osebni vonj (9).

### 1.5 MEHANIZEM ZAZNAVE OSEBNEGA VONJA V ODVISNOSTI OD MHC

Ljudje imamo dva različna sistema receptorjev, ki sodelujeta pri zaznavi vonja: glavni vohalni epitelij in vomeronazalni organ – VNO. Primarno kemoreceptorski sistem VNO nadzoruje reprodukcijsko/razmnoževalno obnašanje. Vendar je malo verjetno, da ima sistem VMO pomembno vlogo pri zaznavi tipa MHC. Raziskave so naredili na miših; mišim so kirurško poškodovali sistem VMO, vendar je miš kljub poškodbi zaznala različne MHC tipe v urinu drugih miši (9). Geni za vohalne receptorje epitelija so na številnih kromosomih, nekaj od teh jih leži tudi v bližini genov lokusa HLA-A, le 1000 kbp stran. Bližina med geni bi lahko bila delno odgovorna za zaznavo vonja, odvisnega od tipa HLA osebe (2).

Z uporabo EEG so raziskali vpliv molekul HLA na možgansko aktivnost. Kadar oseba voča glede na tip HLA sebi podoben vonj, je njena možganska aktivnost večja, kot pa v primeru, ko voča glede na tip HLA sebi različen vonj (**slika 3**). Torej obstaja premo-sorazmerna povezava med podobnostjo v molekulah HLA ter možgansko aktivnostjo (10).



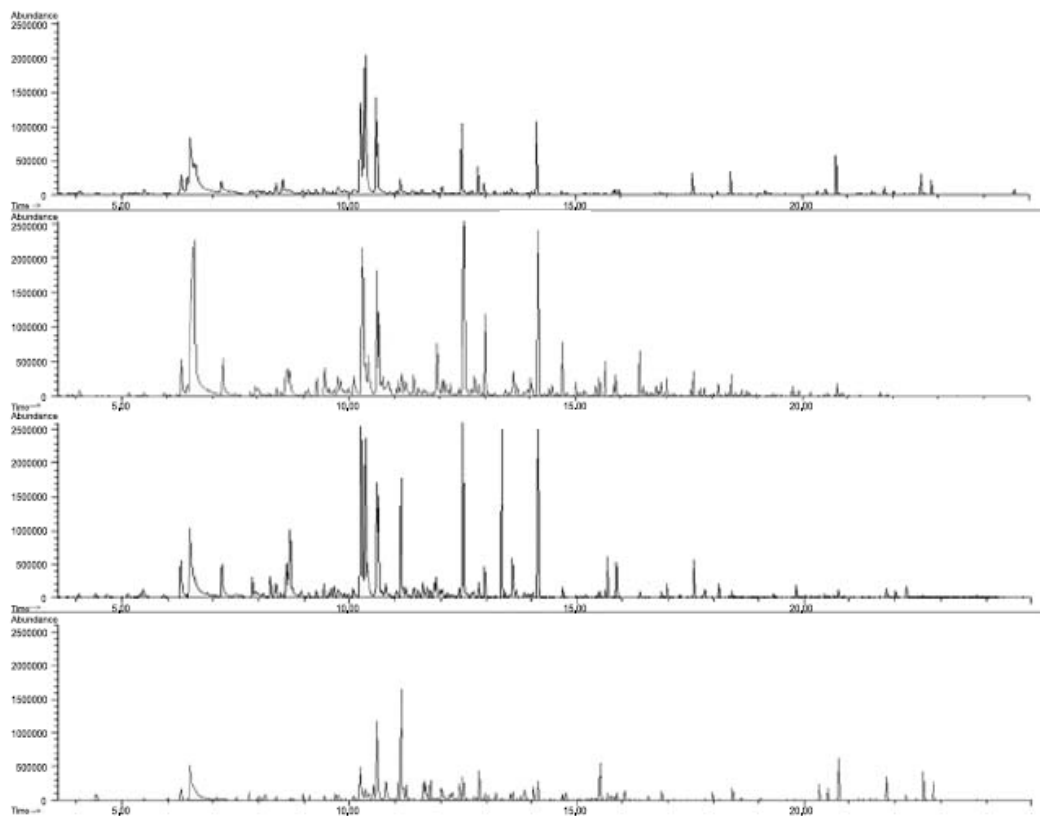
**Slika 3:** Primerjava možganske aktivnosti (EEG); **odebeljena linija** - oseba voča glede na tip HLA sebi podoben vonj, **tanka linija** - oseba voča glede na tip HLA sebi različen vonj (10).

## 1.6 KEMIJSKA SESTAVA OSEBNEGA VONJA

Vonj osebe določa mešanica številnih spojin. V grobem govorimo o treh skupinah vonja razdeljenih glede na izvor. Ločimo primarni vonj, značilen za določeno osebo, ki se ne spreminja, sekundarni vonj, ki je odvisen od diete posameznika ter terciarni vonj, odvisen od zunanjih dejavnikov (npr. različni izdelki za osebno higieno) (11).

Sestava znoja pod pazduh in podplatov se pri posamezniku praktično ne razlikujeta, oba tipa znoja vsebujeta različne metilne in etilne estre nenasičenih kislin, aldehide, ketone, alkohole, alifate, aromate. Analize znoja s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo so pokazale, da se vonj posameznikov ne razlikuje toliko po kvalitativni kot po kvantitativni sestavi. Obstajajo tudi primeri posameznikov, pri katerih se pojavijo zelo specifične spojine,

vendar je verjetno njihov izvor sekundarne ali terciarne narave. Velike razlike med posamezniki se torej pojavijo predvsem v razmerju posameznih spojin prisotnih v znoju (**slika 4**) (11).



**Slika 4:** Kromatogrami analiz znoja kažejo veliko raznolikost v razmerju posameznih spojin v znoju oseb, razlike v kvalitativni sestavi znoja pa so majhne (11).

Navedeni seznam vsebuje spojine, ki so najpogosteje prisotne v človeškem znoju (11):

### ***ALDEHIDI***

heksanal	dekanal
heptanal	undekanal
oktanal	tetradekanal
nonanal	benzaldehyd
2-nonenal	furfural



### ***KARBOKSILNE KISLINE***

dodekanojska kislina

tetradekanojska kislina

### ***KETONI***

6-metil-5-hepten-2-on

6,10-dimetil-5,9-undekadien-2-on

### ***ALKOHOLI***

benzilalkohol

2-furanmetanol

fenol

### ***ALIFATI/AROMATI***

nonan

tetradekan

1-klorononan

heksadekan

dodekan

heptadekan

undekan

pinen

tridekan

naftalen

toluen

## ***ESTRI***

fenil metil acetat

dimetil propandioat

metil heksanoat

dimetil heksadioat

metil oktanoat

metil nonanoat

metil dekanooat

metil undekanoat

metil dodekanoat

metil tridekanoat

metil tetradekanoat

metil pentadekanoat

metil ciklopentantridekanoat

7-metil haksadekenoat

metil furankarboksilat

## ***AMINI***

piridin

### **1.7 MOŠUSI**

Mošusi so spojine prodornega vonja, ki jih uporabljamo za izdelavo parfumov. Najdemo jih v rastlinskem in živalskem svetu (12).

Zgodovina uporabe mošusov sega v začetek človeške civilizacije. Egipčani so jih mešali v barve, s katerimi so poslikavali stene sob. Stari Kitajci so jih darovali bogovom ter jih uporabljali v medicini in parfumeriji. Indijci in Perzijci so uporabljali mošus kot posebej cenjeno vsestransko zdravilo. V srednjem veku so s potovanj po orientu mošuse v Evropo prinesli križarji. Cenjeni so bili v medicini in parfumeriji. V renesansi so v Evropi mošuse uporabljali samo za pripravo najboljših parfumov. Tudi danes so mošusi zelo cenjeni. En gram mošusa lahko stane tudi 50 € in več, najdemo jih le v najdražjih dišavah. Azijci jih uporabljajo v tradicionalni medicini. Uporaba mošusov je široka tudi v homeopatski terapiji (13).

Večina naravnih mošusov je rastlinskega izvora. Poznamo 1.700 rastlin, katerih esencialna olja uporabljamo kot mošuse (13). Mošusi živalskega izvora so redki. Ambroksid pridobivamo iz ambre, sivkastega izločka kitov glavačev. Cibet je mazilu podoben izloček zadnjične žleze afriške cibetovke. Mošek je izloček moškovih žlez, značilen za nerogate jelene, pižmarje (**slika 5**) (12).



**Slika 5:** Pižmar (*Moschus moschiferus*) (13).

## **2 NAMEN DELA**

Osnovni namen diplomskega dela bo dokazati odvisnost med preferenco osebnega vonja in fenotipom HLA na slovenski populaciji. Predpostavljamo hipotezo, da sta si dve osebi po telesnem vonju všeč, kadar sta si različni v molekulah HLA. Za dokazovanje hipoteze bomo uporabili podobno metodo kot Wedekind s sodelavci (1, 2). Metodo bomo v določenih korakih optimirali. Gensko tipizacijo molekul HLA prostovoljcev bodo izvedli na Zavodu RS za transfuzijsko medicino.

Poleg ocenjevanja telesnih vonjev, bodo prostovoljci ocenjevali še vonje izbranih čistih spojin. V ta namen bomo izvedli še dve seansi vohanja. Na prvi seansi bodo prostovoljci vohali kemijske standarde spojin, ki so pogosto prisotne v človeškem znoju. Preverjali bomo, kakšen je vpliv tipa HLA osebe na njeno zaznavo vonja kemijskih standardov. Poskušali bomo odgovoriti na vprašanje, katera spojina v človeškem znoju privlači določen tip HLA. Nato sledi seansa vohanja mošusov. Prostovoljci bodo vohali mošuse, ki jih pogosto uporabljamo v kozmetični industriji. Cilj je ugotoviti potencialen vpliv tipa HLA osebe na zaznavanje vonja mošusov. Ali je možno oblikovati dišavo primerno za posameznikov tip HLA?

Preverili bomo tudi ali fiziološke lastnosti posameznika (spol, menstrualni cikel) vplivajo na preferenco osebnega vonja, vonja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin ter vonja mošusov.

### **3 MATERIALI**

#### **3.1 VZORČENJE OSEBNEGA VONJA**

gel za prhanje (brez parfuma) – Balea MED gel za tuširanje ultra sensitive, dm-Drogerie Markt, Karlsruhe, Nemčija

prašek za perilo (brez parfuma) – Denkmit ultra sensitive Colorwaschmittel, dm-Drogerie Markt, Karlsruhe, Nemčija

bombažne majice – kat.št. 610660, Fruit of the Loom, Warwick, Rhode Island, ZDA

vrečke za shranjevanje majic – kat.št. 1-7093, neoLab, Heidelberg, Nemčija

#### **3.2 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDAROV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN**

pipete; 0,5-50  $\mu\text{L}$  – kat.št. 720020, proline, Biohit, Helsinki, Finska

1-5 mL – kat.št. 720110, proline, Biohit, Helsinki, Finska

nastavki za pipete; 10  $\mu\text{L}$  – kat.št. 70.1130, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija

100  $\mu\text{L}$  – kat.št. 70.760.202, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija

5 mL – kat.št. 70.200, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija

stekleničke za raztopine standardov – kat.št. E153.1, rjave, 4 mL, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija

zamaški za stekleničke – kat.št. E155.1, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija

tesnilo za zamaške – kat.št. E157.1, silikon/teflon, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija

96 % etanol – kat.št. 24106, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija

heksanal – kat.št. 21520, Fluka, Buchs, Švica

heptanal – kat.št. H2120, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

oktanal – kat.št. 05608, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

nonanal – kat.št. 76310, Fluka, Buchs, Švica

dekanal – kat.št. 21400, Fluka, Buchs, Švica

undekanal – kat.št. U2202, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

tetradekanal – kat.št. 70060, Fluka, Buchs, Švica

trans-2-nonenal – kat.št. W321303, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

benzaldehyd – kat.št. 15173, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija  
furfural – kat.št. 319910, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
6-metil-5-hepten-2-on – kat.št. 67320, Fluka, Buchs, Švica  
benzilalkohol – kat.št. 109626, Merck, Darmstadt, Nemčija  
p-krezol – kat.št. 61030, Fluka, Buchs, Švica  
metilheksanoat – kat.št. 21600, Fluka, Buchs, Švica  
2-etilheksanojska kislina – kat.št. 03300, Fluka, Buchs, Švica  
metiloktanoat – kat.št. 21120, Fluka, Buchs, Švica  
metilnonanoat – kat.št. W272418, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
metildekanoat – kat.št. 21480, Fluka, Buchs, Švica  
metilundekanoat – kat.št. 94120, Fluka, Buchs, Švica  
metildodekanoat – kat.št. 61700, Fluka, Buchs, Švica  
metiltetradekanoat – kat.št. 70130, Fluka, Buchs, Švica  
dimetiladipat – kat.št. 186252, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
dimetilmalonat – kat.št. 241040, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
metilfuroat – kat.št. 129852, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
 $\alpha$ -pinen – kat.št. 80604, Fluka, Buchs, Švica  
bis(metiltio)metan – kat.št. W387800, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
3-(metiltio)-1-heksanol – kat.št. W343803, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

### **3.3 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV**

pipete; 0,5-50  $\mu$ L – kat.št. 720020, proline, Biohit, Helsinki, Finska  
1-5 mL – kat.št. 720110, proline, Biohit, Helsinki, Finska  
nastavki za pipete; 10  $\mu$ L – kat.št. 70.1130, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija  
100  $\mu$ L – kat.št. 70.760.202, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija  
5 mL – kat.št. 70.200, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija  
stekleničke za raztopine mošusov – kat.št. E153.1, rjave, 4 ml, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija  
zamaški za stekleničke – kat.št. E155.1, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija  
tesnilo za zamaške – kat.št. E157.1, silikon/teflon, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija  
96 % etanol – kat.št. 24106, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija  
vohalni lističi – kat.št. 1679.1, Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija

androstenol – kat.št. W510718, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
spermin – kat.št. S4264, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
etilenbrazilat – kat.št. W354309, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
Galaxolide<sup>®</sup> – kat.št. 00070302, IFF, New York, New York  
Celestolide<sup>®</sup> – kat.št. 00033412, IFF, New York, New York  
Tonalid<sup>®</sup> – kat.št. 263406, PFW, Aroma chemicals B.V., Barneveld, Nizozemska  
ambretolid – kat.št. 00014200, International Flavors & Fragrances, New York, New York  
pentadekanolid – kat.št. W284009, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
normuskon – kat.št. 29670, Fluka, Buchs, Švica  
muskon – kat.št. 962195, Firmenich SA, Ženeva, Švica  
civeton – kat.št. 926851, Firmenich SA, Ženeva, Švica  
eksaltenon – kat.št. 942008, Firmenich SA, Ženeva, Švica  
ambroksid – kat.št. W347108, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija  
Cashmeran<sup>®</sup> – kat.št. 00032329, IFF, New York, New York  
mošus ksilen – spojino smo sintetizirali po postopku opisanem v Ullmann F. Künstliche  
Moschusriechstoffe. V: Enzyklopädie der technischen Chemie - Neunter Band  
Paracodin bis Santyl. Urban & Schwarzenberg, Berlin, 1921; 614–616  
mošus keton – kat.št. 60720, Fluka, Buchs, Švica

## **4 METODE**

### **4.1 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV**

Prostovoljce, ki so sodelovali pri eksperimentalnem delu diplomskega dela, smo poiskali v krogu naših kolegov na Fakulteti za farmacijo in prijateljev. Želeli smo, da bi bil naš vzorec čimbolj raznolik, zato pri iskanju prostovoljcev nismo določili nobenih posebnih kriterijev.

V študiji je sodelovalo 32 prostovoljcev, 16 žensk in 16 moških. Med seboj se v večini niso poznali. Sodelovala sta tudi dva para sester in en par bratov. Med prostovoljci smo izvedli kratko anketo (v diplomskem delu dodana med priloge), s katero smo pridobili osnovne podatke pomembne za našo raziskavo:

- vsi prostovoljci so se opredelili kot heteroseksualci,
- prostovoljci so stari od 20 do 42 let,
- cigarete kadi 10 prostovoljcev (6 žensk in 4 moški),
- 22 prostovoljcev ima partnerja (od tega je 14 prostovoljcev v resni zvezi – zveza traja več kot leto dni),
- 6 žensk uporablja kontracepcijske tablete.

Prostovoljce smo povabili na kratko predavanje, kjer smo jih seznanili z namenom in potekom raziskave. Po predavanju so podpisali izjavo (v diplomskem delu je dodana med priloge), s katero so potrdili seznanjenje z raziskavo in prostovoljno sodelovanje. Dobili so še natančna navodila in vse potrebne pripomočke za vzorčenje telesnega vonja.

### **4.2 VZORČENJE TELESNEGA VONJA**

Vsak prostovoljec je prejel natančna navodila za vzorčenje telesnega vonja in vrečko z majjico, ki smo oprali s pralnim praškom brez dodanega parfuma. Prosili smo jih, da se za čas vzorčenja poskušajo izogibati kajenju cigaret, pitju alkohola, uživanju česna in čebule, spolnim odnosom, žvečilnim dražejem, zadrževanju v zakajenih prostorih in podobno. Omenjeni dejavniki vplivajo na telesni vonj, povzročijo sekundarni telesni vonj in prekrijejo od molekul HLA odvisen vonj (1, 2).



Vzorčenje telesnega vonja je potekalo po naslednjih navodilih:

- pred spanjem se oprhaj in uporabi poseben šampon brez dodanega parfuma,
- ne uporabljal kozmetičnih izdelkov kot so deodorant, parfüm, losjon,
- obleci si bombažno majico in jo nosi vso noč,
- posteljnina naj ne bo sveža, saj vonj sveže oprane posteljnine vpliva na vonj majice,
- spi sam, ker vonj partnerja vpliva na vonj majice,
- zjutraj pusti ležati majico na postelji,
- čez dan lahko po želji uporabiš kozmetične izdelke,
- drugi večer opisano ponovi,
- majico si tako nosil dve noči,
- zjutraj pusti majico ležati na postelji 15 min (da se osuši, če je vlažna),
- majico daj v posebno vrečko, ki si jo prejel na predavanju,
- vrečko dobro zapri, jo označi s svojo šifro in jo prinesi na seanso vohanja majic.

#### **4.3 SEANSA VOHANJA MAJIC**

Seansa vohanja je potekala v veliki predavalnici Fakultete za farmacijo. Majice, označene z zaporednimi številkami, smo v zaprtih vrečkah zložili po mizah, tako da so bile med seboj oddaljene približno en meter. Prostovoljec se je v predavalnici postavil zraven poljubno izbrane majice. Vrečko z majico je odprl, majico vohal 30 sekund in vrečko zaprl. Sledil je 30 sekund dolg premor. Nato se je prostovoljec pomaknil k naslednji majici. Kroženje je potekalo dokler ni vsak prostovoljec povohal vseh 32 majic. Ob vohanju so ocenili vonj posameznih majic. Podatke so vpisovali v tabelo (v diplomskem delu dodana med priloge). Kriteriji po katerih so ocenjevali vonj majic so bili:

- intenzivnost vonja,
- prijetnost vonja in
- asociacije.

Intenzivnost vonja so ocenili z ocenami od 0 do 10; ocena 0 kadar prostovoljec ni zaznal vonja majice, ocena 1 kadar je zaznal neintenziven vonj in ocena 10 kadar je zaznal zelo intenziven vonj. Prijetnost vonja majic so prostovoljci ocenjevali z ocenami od 1 do 10; ocena 1 kadar vonj majice prostovoljcu ni bil všeč in ocena 10 kadar mu je bil vonj zelo všeč.

Zanimalo nas je tudi, na kaj prostovoljce asociira vonj posamezne majice. Ali jih vonj spominja na telesni vonj sorodnika? Podatek pove ali je oseba sposobna prepoznati sebi soroden tip HLA. Ali jih vonj spominja na bivšega oz. sedanjega partnerja? Odgovor nam pove kakšne partnerje, glede na tip HLA, je prostovoljec že imel. Prostovoljce smo prosili tudi naj označijo, če zaznajo v vonju majic vonj cigaretne dima ali vonj kozmetičnih dišav. S tem smo preverjali ali so se prostovoljci držali navodil za vzorčenje telesnega vonja.

#### 4.4 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDARDOV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN

Sledila je seansa vohanja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin. Izbrali smo spojine, ki so pogosto prisotne v človeškem znoju ter spojine, za katere je znano, da jih različni ljudje različno zaznavajo (2-etilheksanojska kislina, tetradekanal, *trans*-2-nonenal, *p*-krezol, bis(metiltio)metan, 3-(metiltio)-1-heksanol, dimetiladipat in dimetilmalonat). Pripravili smo 1 % etanolne raztopine kemijskih standardov spojin. V stekleničke smo odpipetirali 2 mL etanola in 20  $\mu$ L kemijskega standarda. Spojine z močnejšim vonjem

(*p*-krezol, bis(metiltio)metan, 3-(metiltio)-1-heksanol) smo pripravili v 0,1 % etanolnih raztopinah. V stekleničke smo odpipetirali 2 mL etanola in 2  $\mu$ L kemijskega standarda.

Seansa vohanja je potekala v veliki predavalnici Fakultete za farmacijo. Stekleničke z raztopinami, označene z zaporednimi številkami, smo zložili po mizah, tako da so bile med seboj oddaljene približno en meter. Prostovoljec se je v predavalnici postavil zraven poljubno izbrane stekleničke. Stekleničko je odprl, raztopino vohal 30 sekund in stekleničko zaprl. Sledil je 30 sekund dolg premor. Nato se je prostovoljec pomaknil k naslednji steklenički. Kroženje je potekalo dokler ni vsak prostovoljec povohal vseh 27 raztopin. Ob vohanju so ocenili vonj posameznih raztopin, podatke so vpisovali v tabelo (v diplomskem delu je dodana med priloge). Kriteriji po katerih so ocenjevali vonj raztopine so bili:

- intenzivnost vonja,
- prijetnost vonja in
- asociacije.

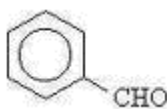
Intenzivnost vonja so ocenili z oceno od 0 do 10; ocena 0 kadar prostovoljec ni zaznal vonja raztopine, ocena 1 kadar je zaznal neintenziven vonj in ocena 10 kadar je zaznal zelo intenziven vonj. Prijetnost vonja raztopin so prostovoljci ocenili z ocenami od 1 do 10; ocena

1 kadar vonj raztopine prostovoljcu ni bil všeč in ocena 10 kadar mu je bil vonj zelo všeč. Zanimalo nas je tudi, na kaj prostovoljce asociira vonj posamezne raztopine. V primeru, da je prostovoljca vonj spominjal na alkohol, smo sklepali, da ne zaznava vonja spojine v etanolni raztopini in spremenili oceno intenzivnosti vonja na vrednost 0.

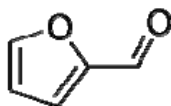
Na seznamu so zaporedne številke (določene za seanso vohanja), imena in kemijske formule spojin, ki smo jih uporabili v seansi:

16) heksanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$
15) heptanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHO}$
14) oktanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CHO}$
13) nonanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$
12) dekanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHO}$
11) undekanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CHO}$
10) tetradekanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CHO}$
18) trans-2-nonenal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CHCHO}$

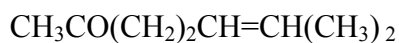
9) benzaldehid



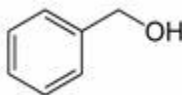
5) furfural

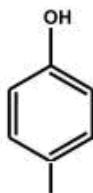


24) 6-metil-5-hepten-2-on



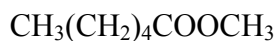
4) benzilalkohol





17) p-krezol

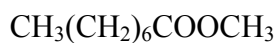
27) metilheksanoat



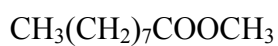
6) 2-etilheksanojska kislina



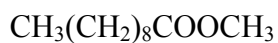
7) metiloktanoat



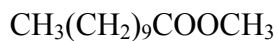
26) metilnonanoat



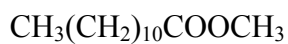
3) metildekanoat



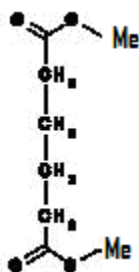
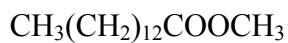
2) metilundekanoat



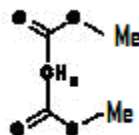
1) metildodekanoat



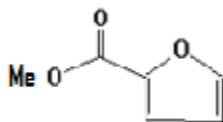
23) metiltetradekanoat



21) dimetiladipat

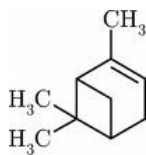


22) dimetilmalonat



8) metil furoat

25)  $\alpha$ -pinen



19) bis(metiltio)metan



20) 3-(metiltio)-1-heksanol



#### 4.5 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV

Nato je sledila seansa vohanja mošusov. Izbrali smo mošuse, ki jih pogosto uporabljamo v parfumski industriji. Pripravili smo 1 % etanolne raztopine mošusov. V stekleničke smo odpipetirali 2 mL etanola in 20  $\mu\text{L}$  mošusa. Spojine z intenzivnejšim vonjem (androstenol) smo pripravili v 0,1 % etanolnih raztopinah. V stekleničke smo odpipetirali 2 mL etanola in 2  $\mu\text{L}$  (mg) mošusa. Pred seanso smo na vohalne lističe nanesti 100  $\mu\text{L}$  raztopine.

Seansa vohanja je potekala v mali predavalnici Fakultete za farmacijo. Lističe, označene z zaporednimi številkami, smo zložili po mizah, tako da so bili med seboj oddaljeni približno en meter. Prostovoljec se je v predavalnici postavil zraven poljubno izbranega lističa. Listič je vohal 30 sekund. Sledil je 30 sekund dolg premor. Nato se je prostovoljec pomaknil k naslednjem lističu. Kroženje je potekalo dokler ni vsak prostovoljec povohal vseh 16 mošusov. Ob vohanju so ocenili vonj posameznih mošusov, podatke so vpisovali v tabelo (v diplomskem delu je dodana med priloge). Kriteriji po katerih so ocenjevali vonj mošusa so bili:

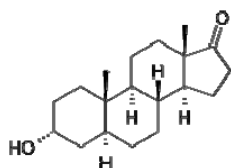
- intenzivnost vonja,
- prijetnost vonja in
- asociacije.

Intenzivnost vonja so ocenili z oceno od 0 do 10; ocena 0 kadar prostovoljec ni zaznal vonja mošusa, ocena 1 kadar je zaznal neintenziven vonj in ocena 10 kadar je zaznal zelo intenziven vonj. Prijetnost vonja mošusa so prostovoljci ocenili z ocenami od 1 do 10; ocena 1 kadar vonj mošusa prostovoljcu ni bil všeč in ocena 10 kadar mu je bil vonj zelo všeč.

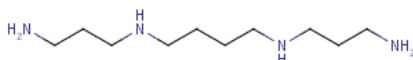
Zanimalo nas je tudi, na kaj prostovoljce asociira vonj posameznega mošusa. V primeru, da je prostovoljca vonj spominjal na alkohol, smo sklepali, da prostovoljec ne zaznava vonja mošusa v etonolni raztopini in spremenili oceno intenzivnosti vonja na vrednost 0.

Na seznamu so zaporedne številke (določene za seanso vohanja), imena in kemijske formule mošusov, ki smo jih uporabili v seansi:

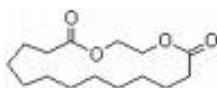
1) androstenol



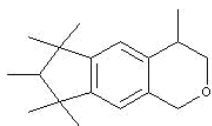
2) spermin



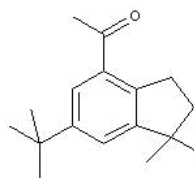
3) etilenbrazilat



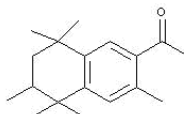
4) Galaxolide<sup>®</sup>



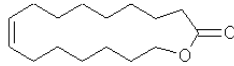
5) Celestolide<sup>®</sup>



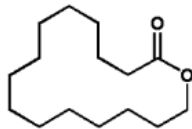
6) Tonalid<sup>®</sup>



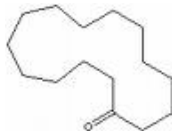
7) ambretolid



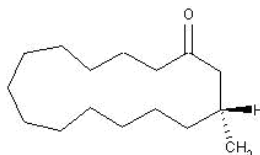
8) pentadekanolid



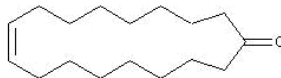
9) normuskon



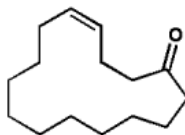
10) muskon



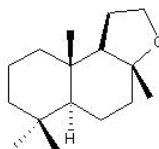
11) civeton



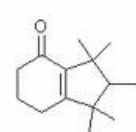
12) eksaltenon



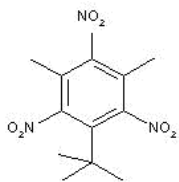
13) ambroksid



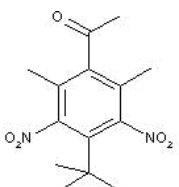
14) Cashmeran<sup>®</sup>



15) mošus ksilen



16) mošus keton



#### 4.6 POSTOPEK GENSKE TIPIZACIJE HLA

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino so organizirali odvzem krvi. Fenotipe HLA so iz krvnih vzorcev določili na Centru za tipizacijo tkiv.

##### Princip genske tipizacije HLA

IZOLACIJA DNK IZ POLNE KRVI Z APARATOM GenoM-6;

- liza vzorca s kaotropsko raztopino (NaI, gvanidijev tiocianat, gvanidijev klorid)
- vezava DNK na magnetne delce
- spiranje (odstranitev nevezanih delcev s kaotropsko raztopino)
- spiranje z etanolom (odstranitev kaotropske raztopine)
- namakanje v vodi (odstranitev etanola)
- raztapljanje DNK v vodi ali pufri
- spektrofotometrično določanje koncentracije izolirane DNK

POMNOŽEVANJE IZOLIRANE DNK Z METODO PCR;

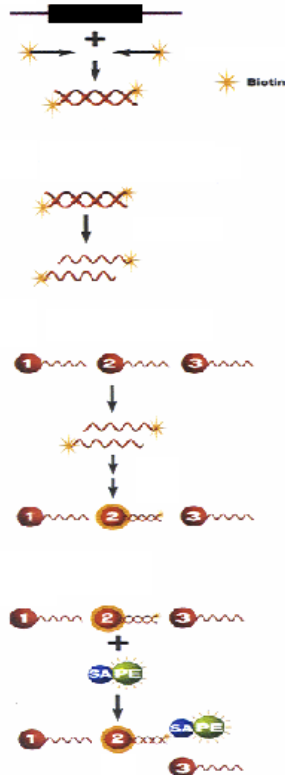
- vzorcu izolirane DNK dodamo set začetnih oligonukleotidov DMIX (vsebuje raznolike začetne olidonukleotide in dideoksi fosforizirane nukleotide) ter encim Taq polimeraza
- prenos vzorca v aparat PCR
- preverjanje uspešnosti pomnoževanja DNK z uporabo gelske elektroforeze



## GENSKA TIPIZACIJA HLA Z METODO LABType SSO (**slika 6**);

- denaturacija pomnožene DNK(z močno bazo)
- nevtralizacija (s kislino)
- hibridizacija s sondami v hibridizacijskem puftru (različne sonde vezane na mikrokroglice, ki različno fluorescirajo)
- spiranje s pufrom (petkrat)
- odstranitev puftra s centrifugiranjem
- označevanje s pufrom SAPE (vsebuje s fikoeritrinom konjugiran streptavidin, streptavidin se poveže z biotinom na začetnem oligonukleotidu, fikoeritrin fluorescira)
- spiranje s pufrom
- odstranitev puftra s centrifugiranjem
- raztapljanje vzorca v puftru
- nanos vzorca v Flow analizator
- obdelava podatkov s programsko opremo
- izpis podatkov in interpretacija

V Flow analizatorju sta dva laserja. Rdeči laser zazna vrsto mikrokroglice in nam da informacijo o lokusu (HLA-A\*, HLA-B\* ali HLA-DRB1\*). Zeleni laser zazna signal fikoeritrina, ki nam da pozitivno ali negativno informacijo o posamezni specifičnosti znotraj preiskovanih lokusov HLA.



Slika 6: Shematski prikaz principa metode LABType SSO.

## 4.7 STATISTIČNE METODE

### *METODA NORMIRANJA VREDNOSTI*

V nabor podatkov pri statističnih analizah smo vključili nenormirane in normirane vrednosti ocen intenzivnosti in prijetnosti vonja. Za normiranje vrednosti smo uporabili enačbo:

$$\text{Normirana vrednost} = \frac{(\text{nenormirana vrednost} - \text{minimalna ocena določene osebe})}{(\text{maksimalna ocena določene osebe} - \text{minimalna ocena določene osebe})}$$

### *SEANSA VOHANJA MAJIC*

Za analizo podatkov pridobljenih na seansi vohaja majic smo uporabili program SPSS verzija 16. Izbrali smo korelacijsko analizo. V analizi smo določali linearno povezanost med skladnostjo v antigenih HLA ter ocenami za intenzivnost in prijetnost telesnega vonja. Korelacijsko analizo smo ponovili za različne nabore podatkov. V **preglednici II** smo zbrali statistično značilne rezultate in vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacijske analize.

### *SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDARDOV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN IN SEANSA VOHANJA MOŠUSOV*

Ocene intenzivnosti in prijetnosti vonja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin in mošusov smo analizirali z enakimi statističnimi metodami, s programom SPSS verzija 16. Vrednosti ocen intenzivnosti in prijetnosti smo normirali. Za analizo ocen smo uporabili dvostranski, neparni t-test. Za neodvisno spremenljivko smo izbrali določen antigen HLA, ki vzorec razdeli na dve skupini. Prva skupina so osebe, ki imajo vsaj en prej določen antigen HLA. Druga skupina so osebe brez določenega antigena HLA. Za vsako skupino nam program SPSS poda povprečne vrednosti ocen intenzivnosti in prijetnosti vonja za posamezno spojino. Povprečne vrednosti nato primerja in glede na predhodno določeno stopnjo značilnosti  $\alpha$ , se odločimo ali sta povprečni vrednosti skupin statistično različni ali ne.

V **preglednicah IV-VII** smo zbrali statistično značilne rezultate analize. Rezultati so podani z vrednostmi P. Pripisani predznak minus ali plus ni del P vrednosti, ampak daje informacijo o tem ali je preiskovana skupina ocenila vonj manj oziroma bolj intenziven ali prijeten. Torej je skupina oseb z določenim antigenom HLA v povprečju ocenila vonj spojine manj oziroma bolj intenziven ali prijeten, kot skupina oseb brez določenega antigena HLA.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV

V **preglednici IA** so zbrani podatki o prostovoljcih. Podatke, navedene v stolpcih spol, starost, kajenje, v vezi, čas v vezi, kontracepcija in teden menstrualnega cikla, smo pridobili z anketo, ki so jo prostovoljci izpolnili. Upoštevanje protokola pri posamezniku smo določili iz podatkov seanse vojanja majic. Osebe, katerih telesni vonj je bil ocenjen kot zelo prijeten ali zelo neprijeten in je pripisana asociacija kazala na kontaminacijo primarnega vonja majice z vonjem sekundarnega izvora, smo zaradi neupoštevanja protokola izločili iz analize rezultatov. V preglednici podajamo tudi podatek o prisotnosti na odvzemu krvnih vzorcev. Osebe, ki se niso udeležile odvzema, nismo vključili v analizo, saj nismo imeli podatka o njihovem tipu HLA.

V raziskavi je sodelovalo 32 oseb;

- 16 moških in 16 žensk,
- starih od 20 do 42 let,
- cigarete kadi 10 oseb,
- 10 oseb je samskih in
- oralno kontracepcijo uporablja 6 žensk.

Rezultati tipizacije HLA so zbrani v **preglednici IB**.

**Preglednica IA: Z anketo pridobljeni podatki o prostovoljcih.**

šifra	spol	starost	kajenje	v vezi	čas v vezi	kontrac.	teden menst.cik.	upoštevanje protokola	odvzem krvi
1	Ž	25	da	da	več	da		ne	da
2	M	28	da	ne				da	da
3	Ž	25	ne	ne		ne	4	da	da
4	Ž	24	da	da	več	da	3	da	ne
5	Ž	23	da	da	do 1 mesec	ne	1	da	da
6	M	25	ne	da	več			da	da
7	Ž	29	ne	da	do 1 mesec	ne	2	da	da
8	M	24	ne	ne				da	da
9	Ž	23	ne	ne		ne	3	da	da
10	M	27	ne	da	več			da	da
11	Ž	23	ne	ne		ne	3	da	da
12	M	24	ne	ne				da	da
13	M	23	ne	da	do pol leta			da	da
14	Ž	26	ne	ne		ne	2	da	da
15	M	26	da	da	do 1 leta			da	da
16	Ž	25	ne	da	do 1 mesec	da	3	da	da
17	M	23	da	da	več			da	da
18	M	20	ne	ne				ne	da
19	Ž	22	da	da	do 1 leta	ne	1	da	ne
20	M	24	ne	ne				da	da
21	Ž	26	ne	da	več	ne	4	da	da
22	Ž	25	da	da	več	ne	4	da	da
23	Ž	25	ne	da	do pol leta	da	1	da	da
24	M	42	ne	da	več			da	da
25	M	35	ne	da	več			da	da
26	Ž	25	da	da	več	da	1	da	da
27	M	20	ne	da	več			da	da
28	Ž	25	ne	da	več	da	3	ne	da
29	M	29	ne	ne				da	da
30	M		ne	da	do 1 leta			da	da
31	Ž	28	ne	da	več	ne	3	da	da
33	M	33	da	da	več			ne	da

**spol** – spol osebe (M – moški, Ž – ženski)

**starost** – starost osebe

**kajenje** – ali oseba kadi

**v vezi/čas v vezi** – ali je oseba v partnerskem odnosu/ koliko časa

**kontrac.** – uporaba kontracepcijskih tablet

**teden menst. cik.** – teden menstrualnega cikla v katerem je bila oseba v času seanse vohanja majic

**upoštevanje protokola** – upoštevanje protokola vzorčenja telesnega vonja

**odvzem krvi** – prisotnost na odvzemu vzorcev krvi ( za tipizacijo HLA)

**Preglednica IB: Rezultati tipizacije HLA.**

šifra	spol	HLA -A*		HLA-B*		HLA-DRB1*	
1	Ž	3	3	7	15	4	15
2	M	2	2	27	39	1	16
3	Ž	2	25	40	44	11	16
4	Ž						
5	Ž	2	2	39	39	12	16
6	M	3	23	40	57	7	11
7	Ž	3	24	41	55	10	13
8	M	2	3	18	35	1	11
9	Ž	1	68	7	37	7	15
10	M	2	24	15	35	11	11
11	Ž	2	24	35	58	1	3
12	M	2	68	35	35	1	14
13	M	3	11	27	35	1	10
14	Ž	2	2	35	35	14	14
15	M	2	68	7	35	3	14
16	Ž	2	68	18	44	7	16
17	M	2	2	51	51	4	4
18	M	3	68	8	15	3	8
19	Ž						
20	M	3	32	51	56	1	11
21	Ž	2	3	51	51	7	11
22	Ž	1	2	15	15	4	4
23	Ž	2	11	7	35	15	15
24	M	1	1	7	27	13	15
25	M	1	24	7	57	1	7
26	Ž	2	2	13	51	1	7
27	M	26	31	15	40	3	11
28	Ž	2	24	38	40	11	16
29	M	26	32	7	51	13	15
30	M	1	29	44	57	3	7
31	Ž	3	11	51	56	11	15
33	M	2	24	15	51	11	13

**spol** – spol osebe (M – moški, Ž – ženski)

**HLA-A\*** - antigen HLA-A\* osebe

**HLA-B\*** - antigen HLA-B\* osebe

**HLA-DRB1\*** - antigen HLA-DRB1\* osebe

## 5.2 SEANSA VOHANJA MAJIC

Z raziskavo smo želeli potrditi, da hipoteza »dve osebi se po vonju privlačita, kadar se razlikujeta v tipu HLA« drži. Vzorčenje telesnega vonja je potekalo tako, da je oseba nosila bombažno majico dve noči. V času vzorčenja vonja naj bi se sodelujoči izogibali kajenju cigaret, pitju alkohola, uživanju česna in čebule, spolnim odnosom, žvečilnim dražajem, zadrževanju v zakajenih prostorih in podobno. Na seansi vohanja majic je sodelovalo 32 oseb. Vsak sodelujoči je ocenil telesni vonj ostalih oseb in vonj samega sebe.

Pred analizo, smo iz nabora podatkov izločili:

- osebe, ki se niso držale protokola vzorčenja telesnega vonja (osebe s šifro 1, 18, 28 in 33) ter
- osebe, ki se niso udeležile odvzema krvi (osebe s šifro 4 in 19).

Izvedli smo korelacijsko analizo. Signifikatno negativno korelacijo med sorodnostjo in prijetnostjo vonja smo ugotovili le v dveh primerih. Kadar izberemo nabor podatkov, ko so ocenjevalci telesnega vonja le moški (podatki, ko oseba voha samo sebe so izločeni), negativna korelacija ni signifikatna. Enako dokažejo predhodne študije (1, 3).

Wedekind in ostali (1) so dokazali, da hipoteza drži samo za ženske ocenjevalke vonja, ki ne jemljejo kontracepcijskih tablet. Deloma to potrdi tudi naša raziskava, vendar le v primeru, kadar primerjamo sorodnost po lokusu HLA-A\* (**preglednica II**). Ženske ocenjevalke vonja, ki jemljejo kontracepcijske tablete, privlači telesni vonj oseb, ki so jim po tipu HLA podobni (5, 8). Naši rezultati kažejo nasprotno. Takšne ženske so ocenile telesni vonj moških, ki so jim po HLA-DRB1\* lokusu podobni, kot manj prijeten (**preglednica II**).

V ostalih primerih naborov ocenjevalcev vonja analize ne potrdijo hipoteze. Na **grafu 1** vidimo, da med sorodnostjo in prijetnostjo telesnega vonja ni povezave.

**Preglednica II: Korelacija med stopnjo skladnosti v antigenih HLA ter intenzivnosti in prijetnosti telesnega vonja ( v oklepaju vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije).**

skladnost v antigenih HLA	nabori ocenjevalcev telesnega vonja					
	brez filtrov	brez sebe	moški brez sebe	ženske brez sebe	ženske brez sebe, z kontracepcijo	ženske brez sebe, brez kontracepcije
lokus HLA-A*					int. neg. (-0,209)	pri. neg. (-0,003)
lokus HLA-B*	int. neg. (-0,109)					
lokus HLA-DRB1*					pri. neg. (-0,191)	
Vsi lokusi skupaj	int. neg. (-0,114)				int. neg. (-0,141)	

**brez filtrov;** pri analizi nismo uporabili filtriranja podatkov

**brez sebe;** pri analizi smo izločili podatke, ko oseba voha samo sebe

**moški brez sebe;** pri analizi smo izločili podatke, ko oseba voha samo sebe ter izbrali le osebe moškega spola

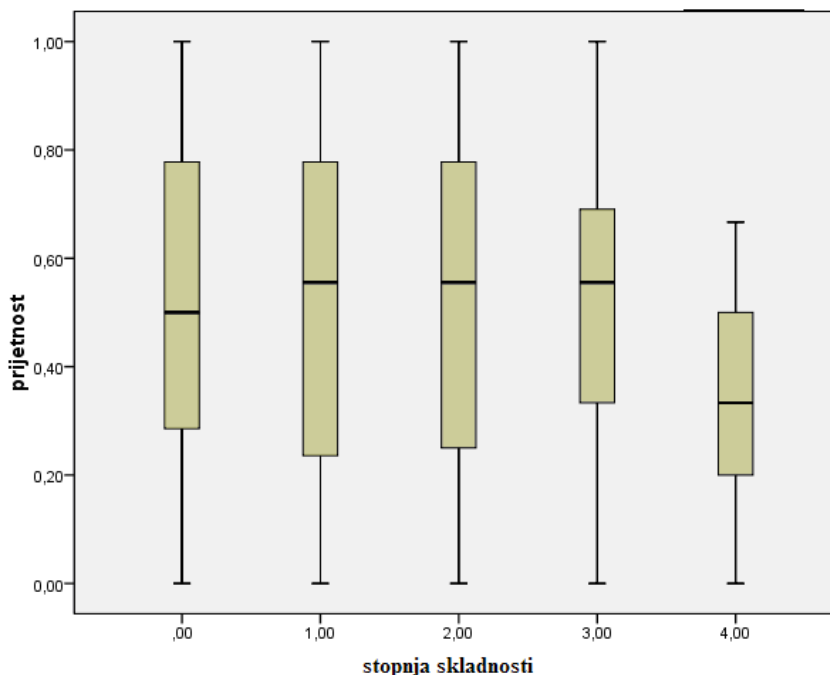
**ženske brez sebe;** pri analizi smo izločili podatke, ko oseba voha samo sebe ter izbrali le osebe ženskega spola

**ženske brez sebe, z kontracepcijo;** pri analizi smo izločili podatke, ko oseba voha samo sebe ter izbrali le osebe ženskega spola, ki uporabljajo kontracepcijske tablete

**ženske brez sebe, brez kontracepcije;** pri analizi smo izločili podatke, ko oseba voha samo sebe ter izbrali le osebe ženskega spola, ki ne uporabljajo kontracepcijskih tablet

**int. neg.;** rezultat analize je signifikatna negativna korelacija intenzivnosti telesnega vonja

**pri. neg.;** rezultat analize je signifikatna negativna korelacija prijetnosti telesnega vonja



**Graf 1:** Grafični prikaz korelacijske analize odvisnosti prijetnosti telesnega vonja od stopnje skladnosti dveh oseb v antigenih HLA,



Analiza rezultatov seanse vohanja majic je pokazala vpliv menstrualnega cikla na prijetnost telesnega vonja, pri ženskah tudi na zaznavo telesnega vonja. Ženske v četrtem tednu cikla so ocenile telesni vonj ženske, ki je prav tako v četrtem tednu cikla, bolj negativno, kot tiste ocenjevalke vonja, ki so bile v drugih tednih cikla (**preglednica III**). Cikel vpliva tudi na telesni vonj ženske. Rezultati pokažejo, da tako moški kot ženske ocenjujejo telesni vonj žensk, ki so v drugem tednu menstrualnega cikla (nastop ovulacije) kot bolj prijeten v primerjavi s telesnim vonjem žensk, ki so v ostalih tednih cikla (**preglednica III**).

Ugotovili smo, da so moški ocenili vonj majic z ženskim telesnim vonjem kot bolj prijeten od vonja majic z moškim vonjem. Ocenjevanje je bilo slepo, torej ocenjevalci med vohanjem posameznih majic niso vedeli kakšnega spola je bila oseba, ki je majico nosila. Zanimivo je, da so tudi ženske ocenile, da je vonj ženskih majic prijetnejši (**preglednica III**).

**Preglednica III: Vpliv spola in menstrualnega cikla na prijetnost osebnega vonja (prikazane so povprečne ocene prijetnosti vonja).**

		spol in menstrualni cikel osebe, katere vonj se ocenjuje				
		moški	ženski (1. teden)	ženski (2. teden)	ženski (3. teden)	ženski (4. teden)
spol in menstrualni cikel osebe, ki ocenjuje telesni vonj	moški	4,10±0,30	3,47±0,27	5,26±0,38	4,27±0,22	4,83±0,36
	ženski (1. teden)	4,40±0,73	4,67±0,75	8,38±1,00	4,95±0,70	5,50±0,88
	ženski (2. teden)	3,90±0,98	3,14±0,96	5,50±1,50	4,33±0,78	4,00±1,29
	ženski (3. teden)	4,34±0,48	4,45±0,59	6,83±0,83	4,50±0,46	4,18±0,76
	ženski (4. teden)	4,19±0,75	3,20±0,61	5,67±0,99	4,76±0,60	3,13±1,09

**ženski (1.teden);** oseba, ki ocenjuje telesni vonj je ženska v 1. tednu menstrualnega cikla

**ženski (2.teden);** oseba, ki ocenjuje telesni vonj je ženska v 2. tednu menstrualnega cikla

**ženski (3.teden);** oseba, ki ocenjuje telesni vonj je ženska v 3. tednu menstrualnega cikla

**ženski (4.teden);** oseba, ki ocenjuje telesni vonj je ženska v 4. tednu menstrualnega cikla

(v 4. tednu se pojavi mesečno perilo)

Pri ocenjevanju telesnega vonja nas je zanimalo tudi, na kaj prostovoljce asociira vonj posamezne majice. Ali jih vonj spominja na telesni vonj sorodnika? Takšen podatek nam pove ali oseba prepozna sebi podoben tip HLA. Ali jih vonj spominja na bivšega oz. sedanjega partnerja? Odgovor nam pove kakšne partnerje, glede na tip HLA, je oseba imela do sedaj. Število zbranih podatkov o tem tipu asociacij je bilo premajhno, da bi lahko jih lahko statistično obdelali.

### **5.3 SEANSA VOHANJA KEMIJSKIH STANDARDOV V ZNOJU PRISOTNIH SPOJIN**

Analiza rezultatov seanse vohanja kemijskih standardov je pokazala, da osebe z določenimi antigeni HLA zaznavajo vonj posameznih kemijskih standardov signifikatno bolj oz. manj intenzivno ali signifikatno bolj oz. manj prijetno (preglednici IV in V). Tako je na primer za osebe z vsaj enim antigenom HLA-A\*3 značilno, da ocenjujejo vonj standarda številka 7 in 23 statistično značilno manj intenziven in vonj standarda številka 23 statistično značilno bolj prijeten. Na enak način razložimo tudi rezultate analiz za druge določene antigene HLA.

Ker je bilo na istem setu podatkov testirano večje število statističnih hipotez, se je potrebno zavedati da pri posamezni hipotezi obstaja pet procentov verjetnosti, da smo jo sprejeli po krivem. V celoti obstaja precej velika verjetnost, da nekaj od vseh sprejetih hipotez ne drži.

**Preglednica IV: Zaznava intenzivnosti (zgornja preglednica) in prijetnosti (spodnja preglednica) vonja kemijskih standardov glede na posamezne antigene HLA – nenormirane vrednosti (vrednosti P za dvostranski, neparni t-test; prikazane so vrednosti le P manjše od 0,05).**

številka standarda	1	4	6	7	9	10	11	12	15	17	18	19	21	23	24	25	27
antigeni HLA																	
HLA-A*3				-0,000					+0,006					-0,001	+0,043		
HLA-A*2															+0,008	+0,009	
HLA-A*24																	
HLA-A*68												-0,046					
HLA-B*35			-0,046						+0,041		-0,046				+0,048		
HLA-B*51							-0,041										-0,036
HLA-B*7					+0,026												
HLA-B*15							-0,011	-0,042		-0,036						-0,022	
HLA-DRB1*11																	
HLA-DRB1*1						+0,022							+0,009				
HLA-DRB1*7								-0,046		-0,032			-0,034				
HLA-DRB1*15																	
HLA-DRB1*3																	
HLA-DRB1*16	+0,019	-0,041						+0,025						+0,007			+0,002

številka standarda	2	3	4	5	7	10	11	13	17	19	20	22	23	25	26	27
antigeni HLA																
HLA-A*3																
HLA-A*2													+0,024			
HLA-A*24									+0,041							
HLA-A*68		-0,010														
HLA-B*35	-0,007				-0,046											
HLA-B*51					+0,021		+0,022	+0,038		-0,032					+0,021	+0,000
HLA-B*7						+0,042										
HLA-B*15	-0,000	-0,013	-0,003													
HLA-DRB1*11												-0,009				
HLA-DRB1*1												-0,036			-0,036	
HLA-DRB1*7	+0,043					+0,020					-0,010		+0,007			
HLA-DRB1*15																
HLA-DRB1*3	-0,012	-0,021														
HLA-DRB1*16														-0,008		-0,011

+ osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj standarda bolj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi  
 - osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj standarda manj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi  
 rdeča barva ujemanje rezultatov analize prijetnosti in intenzivnosti vonja  ujemanje z normiranimi vrednostmi

Preglednica V: Zaznava intenzivnosti (zgornja preglednica) in prijetnosti (spodnja preglednica) vonja kemijskih standardov glede na posamezne antigene HLA – normirane vrednosti (vrednosti P za dvostranski, neparni t-test; prikazane so le vrednosti P manjše od 0,05).

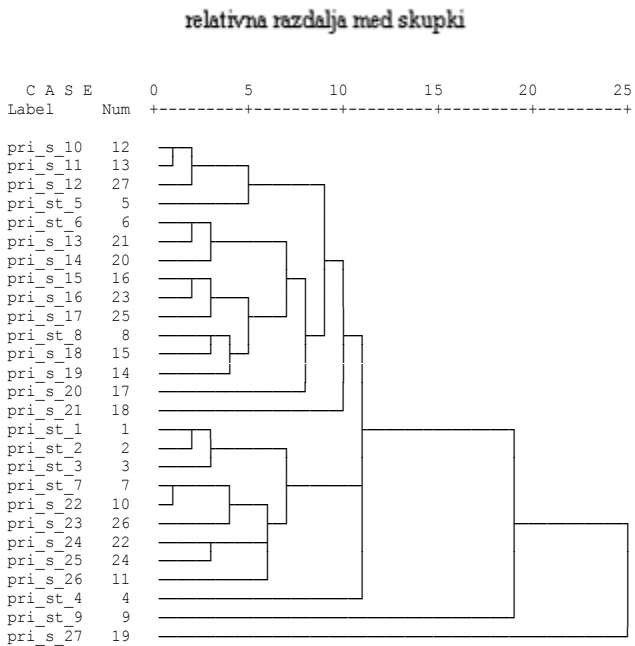
številka standarda	2	3	4	7	9	10	11	12	17	18	19	20	23	24	25	26	27
antigeni HLA																	
HLA-A*3			-0,040	-0,000													
HLA-A*24														+0,007	+0,008		
HLA-A*68		+0,022															
HLA-B*35									+0,047	-0,032	-0,017			+0,033			
HLA-B*51												+0,048	-0,006				
HLA-B*7					-0,032												
HLA-B*15							-0,040										
HLA-DRB1*11						+0,019											
HLA-DRB1*1																	
HLA-DRB1*7	-0,027							-0,019								-0,042	-0,006
HLA-DRB1*15			+0,024								-0,020						
HLA-DRB1*3		+0,024		+0,036				+0,021					+0,001				+0,000
HLA-DRB1*16			-0,001														

številka standarda	2	3	4	7	8	10	11	12	17	19	20	21	22	23	24	25	26	27
antigeni HLA																		
HLA-A*3																		
HLA-A*2								-0,023	-0,028						+0,040			
HLA-A*24																		
HLA-A*68		-0,004																
HLA-B*35	-0,010			-0,016														+0,015
HLA-B*51				+0,006			+0,004											+0,000
HLA-B*7																		
HLA-B*15	-0,006											-0,024	-0,031					
HLA-DRB1*11													-0,013					
HLA-DRB1*1				-0,019														
HLA-DRB1*7				+0,028	+0,016	+0,017					-0,003			+0,015				-0,038
HLA-DRB1*15				+0,007														
HLA-DRB1*3	-0,003	-0,008																
HLA-DRB1*16																-0,020		-0,008

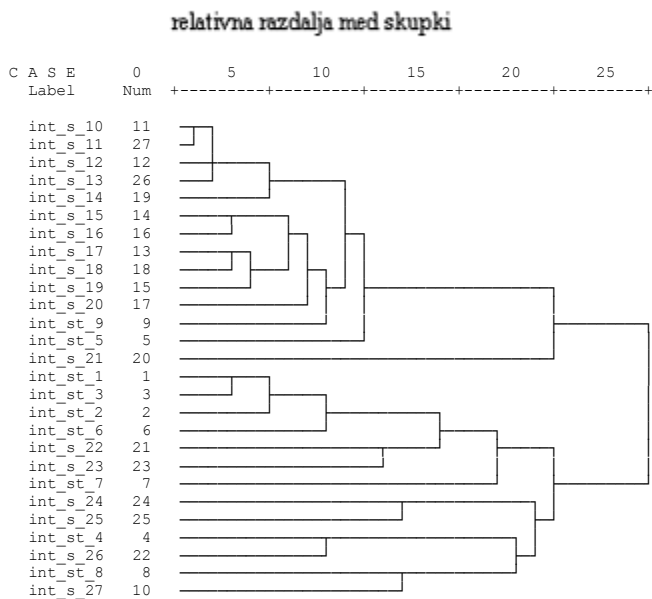
+ osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj standarda bolj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi  
 - osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj standarda manj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi  
 rdeča barva ujemanje rezultatov analize prijetnosti in intenzivnosti vonja  ujemanje z nenormiranimi vrednostmi

Analiza skupkov vrednosti ocen prijetnosti in intenzivnosti vonja kemijskih standardov je pokazala, da se tvorijo posamezne skupine, ki so si podobne po kemijskih formulah;

- alifatski kratkoverižni aldehidi: heksanal, heptanal (**slika 7**, spojini številka 16 in 15),
- alifatski srednjeverižni aldehidi: oktanal, nonanal, dekanal, undekanal, tetradekanal (**slika 8**, spojine številka 14, 13, 12, 11 in 10),
- sistemi konjugiranih dvojnih vezi: trans-2-nonenal, p-krezol (**slika 8**, spojini številka 18 in 17),
- metilni estri srednjeverižnih alifatskih kislin: metil dekanoat, metil undekanoat, metil dodekanoat (**slika 7**, spojini številka 3, 2 in 1).



**Slika 7:** Dendrogram analize skupkov nenormiranih vrednosti prijetnosti vonja kemijskih standardov.



**Slika 8:** Dendrogram analize skupkov nenormiranih vrednosti intenzivnosti vonja kemijskih standardov.

#### **5.4 SEANSA VOHANJA MOŠUSOV**

Analiza rezultatov seanse vohanja mošusov je pokazala, da osebe z določenimi antigeni HLA zaznavajo vonj nekaterih mošusov signifikatno bolj oz. manj intenzivno ali signifikatno bolj oz. manj prijetno (preglednici VI in VII). Tako je na primer za osebe z vsaj enim antigenom HLA-A\*3 značilno, da ocenjujejo vonj standardov številka 3, 4, 11 in 15 statistično značilno bolj intenziven in vonj standarda številka 8 statistično značilno bolj prijeten. Na enak način razložimo tudi rezultate analiz za druge določene antigene HLA.

Ker je bilo na istem setu podatkov testirano večje število statističnih hipotez, se je potrebno zavedati da pri posamezni hipotezi obstaja pet procentov verjetnosti, da smo jo sprejeli po krivem. V celoti obstaja precej velika verjetnost, da nekaj od vseh sprejetih hipotez ne drži.

**Preglednica VI: Zaznava intenzivnosti (zgornja preglednica) in prijetnosti (spodnja preglednica) vonja mošusovglede na posamezne antigene HLA – nenormirane vrednosti (vrednosti P za dvostranski, neparni t-test; prikazane so vrednosti le P manjše od 0,05).**

števila mošusa	2	3	4	5	9	10	11	13	14	15	16
antigeni HLA											
HLA-A*3		+0,025	+0,008				+0,003			+0,007	
HLA-A*2		-0,003					-0,016		-0,037		
HLA-A*24				+0,004							+0,043
HLA-A*68	-0,046										
HLA-B*35	-0,042										
HLA-B*51						+0,026					
HLA-B*7	-0,006										
HLA-B*15											
HLA-DRB1*11											
HLA-DRB1*1											
HLA-DRB1*7							-0,027	+0,026			
HLA-DRB1*15	-0,002	-0,003		-0,028	+0,004						
HLA-DRB1*3											
HLA-DRB1*16											

števila mošusa	1	3	4	5	6	7	8	10	12	14	15
antigeni HLA											
HLA-A*3							+0,041				
HLA-A*2			-0,020								
HLA-A*24					+0,028						+0,043
HLA-A*68					+0,000					+0,000	
HLA-B*35		-0,040									
HLA-B*51											
HLA-B*7											
HLA-B*15											
HLA-DRB1*11											
HLA-DRB1*1	-0,031			-0,039							
HLA-DRB1*7								+0,000			
HLA-DRB1*15				+0,004		+0,010			+0,020		
HLA-DRB1*3											-0,038
HLA-DRB1*16					-0,021						-0,032

+ osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj mošusa bolj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi

- osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj mošusa manj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi

rdeča barva ujemanje rezultatov analize prijetnosti in intenzivnosti vonja  ujemanje z normiranimi vrednostmi



**Preglednica VII: Zaznava intenzivnosti (zgornja preglednica) in prijetnosti (spodnja preglednica) vonja mošusov glede na posamezne antigene HLA – normirane vrednosti (vrednosti P za dvostranski, neparni t-test; prikazane so le vrednosti P manjše od 0,05).**

število mošusa	2	3	4	5	7	8	9	10	11	13	14	16
antigeni HLA												
HLA-A*3			-0,023						-0,014			
HLA-A*2		+0,002							+0,014		+0,033	
HLA-A*24												
HLA-A*68												-0,000
HLA-B*35	-0,047				+0,030							-0,007
HLA-B*51								+0,015				
HLA-B*7	-0,029											
HLA-B*15							+0,014					
HLA-DR B1*11												
HLA-DR B1*1												
HLA-DR B1*7									-0,018	+0,006		
HLA-DR B1*15	-0,013	-0,006		-0,014				+0,021				
HLA-DR B1*3						+0,049						
HLA-DR B1*16							-0,007				+0,005	

število mošusa	1	2	3	4	6	7	8	10	11	12	14
antigeni HLA											
HLA-A*3							+0,034				
HLA-A*2				-0,013							
HLA-A*24		-0,020			+0,031			-0,033			
HLA-A*68		+0,002			-0,003						-0,003
HLA-B*35			-0,042								
HLA-B*51		-0,015									
HLA-B*7											
HLA-B*15										-0,045	
HLA-DR B1*11					+0,024				-0,016		
HLA-DR B1*1											
HLA-DR B1*7								+0,043			
HLA-DR B1*15					+0,018	+0,035		-0,029			
HLA-DR B1*3											-0,001
HLA-DR B1*16	+0,006				-0,019						

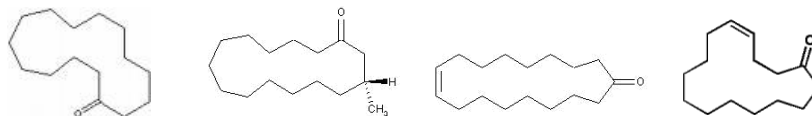
+ osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj mošusa bolj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi

- osebe z vsaj enim antigenom HLA določene vrste, ki so ocenile vonj mošusa manj intenziven/prijeten, v primerjavi z ostalimi sodelujočimi

rdeča barva ujemanje rezultatov analize prijetnosti in intenzivnosti vonja  ujemanje z nenormiranimi vrednostmi

Analiza skupkov vrednosti ocen vonja mošusov je pokazala, da se tvorijo posamezne skupine, ki so si podobne po kemijskih formulah;

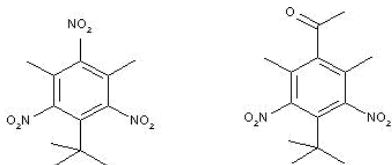
- veliki ciklični ketoni: normuskon, muskon, civeton, eksaltenon (**slika 9**, spojine številka 9, 10, 11 in 12),

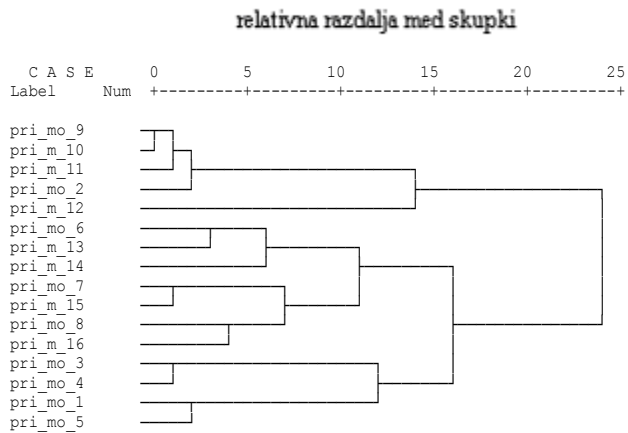


- dvociklični ketoni s številnimi metilnimi substituentami: Celestolide<sup>®</sup> in Tonalid<sup>®</sup> (**slika 10**, spojini številka 5 in 6),

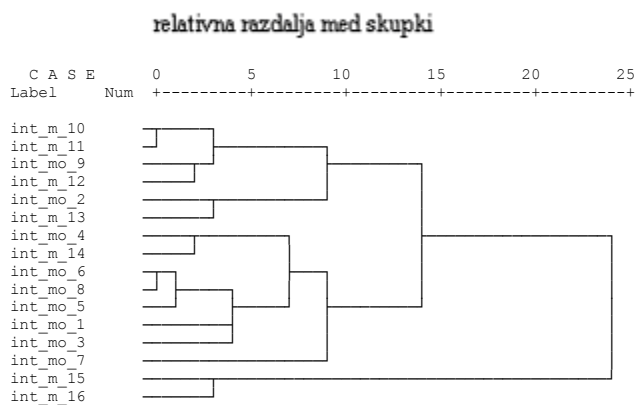


- nitro mošusi: mošus ksilen, mošus keton (**slika 10**, spojine številka 15 in 16).





**Slika 9:** Dendrogram analize skupkov nenormiranih vrednosti prijetnosti vonja mošusov.



**Slika 10:** Dendrogram analize skupkov nenormiranih vrednosti intenzivnosti vonja mošusov.

## 6 SKLEP

Osnovni namen diplomskega dela, smo dosegli: pokazali smo odvisnost med preferenco osebnega vonja in tipa HLA na slovenski populaciji, in s tem potrditi študijo Wedekinda s sodelavci oziroma hipotezo, da sta si dve osebi po telesnem bolj vonju všeč, kadar sta si različni v molekulah HLA. Rezultati so deloma potrdili omenjeno hipotezo, vendar le v primeru, ko smo primerjali stopnjo sorodnosti v antigenih HLA določenih lokusov (HLA-A\* in HLA-DRB1\*) s preferenco telesnega vonja. Ženske ocenjevalke vonja privlači telesni vonj oseb, ki so od njih po tipu HLA čimbolj različne. Rezultati so pokazali tudi statistično značilen vpliv menstrualnega cikla na preferenco vonja pri ženskah. Ženske v četrtem tednu cikla so ocenile telesni vonj žensk, ki so bile v istem tednu cikla, bolj negativno kot tiste ocenjevalke vonja, ki so bile v drugih tednih cikla. Menstualni cikel vpliva tudi na telesni vonj žensk. Rezultati kažejo, da so tako moški kot ženske ocenili telesni vonj žensk, ki so bile v drugem tednu cikla (nastop ovulacije) kot bolj prijeten, v primerjavi s telesnim vonjem žensk, ki so bile v drugih tednih cikla. Ugotovili smo, da na telesni vonj vpliva tudi spol. Moški in ženske so ocenili vonj majic z ženskim telesnim vonjem kot bolj prijeten od vonja majic z moškim vonjem. Ocenjevanje je bilo slepo, torej ocenjevalci med vohanjem majic niso vedeli kakšnega spola je bila oseba, ki je nosila majico.

Analiza podatkov pridobljenih na seansi vohanja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin kažejo, da tip HLA vpliva na preferenco vonja kemijskih standardov. Osebe z določenimi antigeni HLA ocenjujejo vonj določenih standardov kot bolj ali manj intenziven oziroma prijeten.

V nadaljnih raziskavah predlagamo primerjavo kvalitativne in kvantitativne sestave znoja oseb z rezultati analize vpliva tipa HLA na preferenco v znoju prisotnih spojin.

Z analizo podatkov iz seanse vohanja mošusov smo dokazali, da na preferenco vonja mošusov vpliva tip HLA oseb, ki ocenjujejo vonj. Osebe z določenimi antigeni HLA ocenjujejo vonj določenih mošusov kot bolj ali manj intenziven oziroma prijeten. Dokazali smo, da bi teoretično lahko pripravili parfüm, ki bil bil privlačen za osebe določenim tipom HLA.

Med samimi raziskavami smo se naučili veliko novega in zanimivega, porodile pa so se tudi nove ideje.

## 7 LITERATURA

1. Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ (1995). *MHC-dependent mate preferences in humans*. Proceedings of Biological Sciences 260: 245-249.
2. Wedekind C, Furi S (1997). *Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity?* Proceedings of Biological Sciences 264: 1471-1479.
3. Santos PS, Schinemann JA, Gabardo J, Bicalho Mda G (2005). *New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students*. Hormones and Behavior 47: 384-388.
4. Vozelj M (2000). *Temelji imunologije, 1. izdaja*. DZS, Ljubljana: 159-171.
5. Singh PB (2001). *Chemosensation and genetic individuality*. Reproduction 121: 529-539.
6. Ober C, Weitkamp LR, Cox N, Dytch H, Kostyu D, Elias S (1997): *HLA and mate choice in humans*. American Journal of Human Genetics 61: 497-504.
7. Eklund AC, Belchak MM, Lapidus K, Raha-Chowdhury R, Ober C (2000). *Polymorphisms in the HLA-linked olfactory receptor genes in the hutterites*. Human Immunology 61: 711-717.
8. Ihara Y, Aoki K, Tokunaga K, Takahashi K, Juji T (2000). *HLA and human mate choice: Tests on Japanese couples*. Anthropological Science 108: 199-214.
9. Penn D, Potts W (1998). *How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences?* Advances in Immunology 69: 411-436.
10. Pause BM, Krauel K, Schrader C, Sojka B, Westphal E, Muller-Ruchholtz W, Ferstl R (2006). *The human brain is a detector of chemosensorily transmitted HLA-class I-similarity in same- and opposite-sex relations*. Proceedings of Biological Sciences 273: 471-478.
11. Curran AM, Rabin SI, Prada PA, Furton KG (2005). *Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS*. Journal of Chemical Ecology 31: 1607-1619.
12. Dolinar K (2000). *Leksikon Cankarjeve založbe, 3. izdaja*. Cankarjeva založba, Ljubljana: 27, 154, 663.

13. Heekmann S (2000).: *Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Nitromoschusverbindungen im Hausstaub*. Diplomsko delo na Univerzi Oldenburg, Oldenburg: 4-7.

## 8 **PRILOGE**

V prilogah so:

- izjava za prostovoljce,
- anketa za prostovoljce,
- tabela za seanso vohanja majic,
- tabela za seanso vohanja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin,
- tabela za seanso vohanja mošusov.

### **Priloga I: Izjava za prostovoljce.**

Spodaj podpisani/-a \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (ime, priimek, rojstni datum),  
izjavljam, da sem seznanjen/-a z namenom in natančnim potekom raziskave v kateri sodelujem kot prostovoljec. Za sodelovanje mi ni obljubljena nagrada ali plačilo.

Podpis: \_\_\_\_\_





**Priloga III: Preglednica za seanso vohanja majic.**

TVOJA ŠIFRA: \_\_\_\_\_

ŠT. MAJČKE	INTENZIVNOST VONJA	PRIJETNOST VONJA	ASOCIACIJA (ni obvezno)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			

INTENZIVNOST VONJA 0 – 10 ( 0 – nič ne voham, 1- neintenziven, 10 – zelo intenziven)

PRIJETNOST VONJA 1 – 10 ( 1 – ni mi všeč, 10 – zelo mi je všeč)

ASOCIACIJA – vonj me spominja na (bivšega) partnerja, vonj me spominja na sorodnika, vonj me spominja na cigaretni dim, vonj me spominja na parfum, vonj me spominja na...

**Priloga IV: Preglednica za seanso vohanja kemijskih standardov v znoju prisotnih spojin.**

TVOJA ŠIFRA: \_\_\_\_\_

ŠT. STANDARDA	INTENZIVNOST VONJA	PRIJETNOST VONJA	ASOCIACIJA (ni obvezno)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			

INTENZIVNOST VONJA 0 – 10 ( 0 – nič ne voham, 1- neintenziven, 10 – zelo intenziven)

PRIJETNOST VONJA 1 – 10 ( 1 – ni mi všeč, 10 – zelo mi je všeč)

**Priloga V: Preglednica za seanso vohanja mošusov.**

TVOJA ŠIFRA: \_\_\_\_\_

ŠT. MOŠUSA	INTENZIVNOST VONJA	PRIJETNOST VONJA	ASOCIACIJA (ni obvezno)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

INTENZIVNOST VONJA 0 – 10 (0 – nič ne voham, 1- neintenziven, 10 – zelo intenziven)

PRIJETNOST VONJA 1 – 10 (1 – ni mi všeč, 10 – zelo mi je všeč)