

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra zoologie



Změny v preferencích heterozygotnosti MHC genů
v průběhu menstruačního cyklu

Changes in preferences for heterozygosity in MHC genes
across the menstrual cycle

Diplomová práce

Kateřina Ptáčková

Vedoucí diplomové práce: doc. Jan Havlíček, PhD.

V Praze 2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citovaných literárních pramenů.

V Praze dne 31. 8. 2010

Kateřina Ptáčková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Janu Havlíčkovi PhD., především za sestavení konceptu výzkumu, ale také za cenné rady a pomoc v průběhu tohoto výzkumu. Dále doc. MUDr. Zdeňce Gašové CSc. za vstřícnost a ochotu, bez které by nebyla spolupráce s Ústavem hematologie a krevní transfúze, a tudíž i s dárci krve, možná. Také bych chtěla poděkovat Kateřině Vávrové za laboratorní část a typizaci MHC genů účastníků, Pavlíně Lenochové za cenné rady ohledně techniky sběru pachových vzorků, Aničce Rubešové za pomoc s přesnou technologií pořizování fotografií tváří, Jarce Valentové za připomínky k práci s hlasovými nahrávkami a Káče Klapilové a Lence Novákové za rady ohledně analýzy dat.

V neposlední řadě děkuji také Terce Dneboské, za psychickou podporu a pomoc při samotném testování, Fose a Pavlu Pipkovi za cenné komentáře a připomínky nejen v průběhu psaní této diplomové práce a Honzovi Blecherovi za podporu a trpělivost v průběhu celého projektu.

A samozřejmě všem dárcům krve, kteří mě neodmítli a tohoto výzkumu se zúčastnili.

Tato diplomová práce vznikla díky ocenění Owen F. Aldis Award společnosti The International Society for Human Ethology.

Abstrakt

Produkty genů hlavního histokompatibilního systému (MHC) hrají klíčovou roli v imunitním systému obratlovců. Předchozí studie u různých druhů obratlovců ukazují, že heterozygotnost v rámci MHC genů přináší lepší obranyschopnost organismu a že heterozygoti jsou preferováni jako partneři. Lidské studie jsou v tomto ohledu ambivalentní, což může být dáno efektem některých modulujících faktorů jako je například reprodukční stav. Zajímalo nás proto, zda dochází ke změnám v hodnocení atraktivity tváře, pachu a hlasu v průběhu menstruačního cyklu.

Výzkumu se zúčastnilo 51 mužů a vzorky hodnotilo 52 žen, z nichž 23 užívalo hormonální antikoncepci a 29 přirozeně cyklovalo. Typizovány byly alely -A, -B a -DR. Všechny pachové stimuly, fotografie tváře a hlasové nahrávky mužů byly hodnoceny opakovaně, kdy ženy byly pozvány tak, aby jedno hodnocení probíhalo ve folikulární a jedno v luteální fázi cyklu. Hodnocení probíhalo na sedmibodové škále. K analýze dat byla využita ANOVA s opakovanými měřeními.

Změny v souvislosti s fází cyklu i heterozygotností se projeví nejvíce na hodnocení hlasových nahrávek. Hlas homozygotů byl hodnocen lépe než hlas heterozygotů, a to především ve folikulární fázi, kdy byl navíc hodnocen jako atraktivnější než během luteální fáze cyklu. Podobný posun k vyššímu hodnocení ve folikulární fázi cyklu se projevil i u homozygotních tváří, nicméně rozdíl mezi tvářemi homozygotů a heterozygotů nebyl signifikantní. V hodnocení atraktivity hlasu bez ohledu na heterozygotnost byl zaznamenán rozdíl mezi folikulární a luteální fází cyklu. Cyklující ženy hodnotily hlasy lépe, pokud se nacházely ve folikulární fázi cyklu. Toto hodnocení se lišilo od žen, které užívaly HA, a navíc ženy užívající HA hodnotily v obou fázích cyklu atraktivitu hlasu podobně. Zjistili jsme také, že na hodnocení má vliv pořadí testování, kdy se trend hodnotit lépe během druhého sezení prokázal u atraktivity tváří.

Preference ve prospěch homozygotů mohou být důsledkem preferencí pro specifické kombinace alel, které jsou pro dané podmínky nejvhodnější. Vzhledem k tomu, že naši účastníci výzkumu byli dárci krve, homozygoti, kteří splňovali zdravotní kritéria, mohli nést vhodné alelické kombinace.

Abstract

Products of major histocompatibility complex (MHC) plays key role in immune system of vertebrates. Prior studies on different vertebrate species show, that heterozygosity in MHC genes is linked to more efficient immune system and preferred in mate choice. Results of human studies are ambivalent, which can be due to the effect of some modulating factors like reproductive status. Therefore, our aim was to test heterozygosity related preferences in faces, odor and voice across menstrual cycle.

Our sample consisted of 51 men and 52 women, from which 23 used hormonal contraception and 29 had natural cycle. They were genotyped in -A, -B and -DR alleles. All odor stimuli, face photos and voice records were rated on seven-point scale in both follicular and luteal phase. Repeated measures ANOVA was used for the analysis.

Changes in ratings across the menstrual cycle and heterozygosity were most discernible on voice ratings. Voices of homozygous males were rated more attractive than voices of heterozygous males especially in follicular phase. Similar shift to higher ratings in follicular phase was manifested in ratings of homozygous male faces, but the difference between homozygous males and heterozygous males was not significant. Women with natural cycle also rated voices higher in their follicular phase and these ratings were higher than ratings from women using hormonal contraception. Women tend to rate faces higher during second session.

Preferences for homozygous males can be result of preferences for specific combinations of alleles, which are optimal for the actual environment. All research participants were blood donors, therefore homozygous participants fulfill all health criteria and can carry suitable combinations of alleles.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
1. Úvod	8
2. Teoretický přehled.....	9
2.1 Pohlavní výběr a kvalita organismu	9
2.2 Co jsou geny MHC	9
2.2.1 Princip fungování MHC genů	10
2.2.2 Polymorfismus.....	12
2.2.3 Mechanismy vzniku polymorfismu.....	13
2.3 Projev MHC.....	16
2.3.1 MHC a pach.....	16
2.3.2 MHC a tvář	18
2.4 Výběr partnera	19
2.4.1 Souvislost mezi MHC a výběrem partnera.....	20
2.4.2 Heterozygotnost a atraktivita.....	21
2.4.3 Podobnost alel a atraktivita	24
2.4.4 Vliv antikoncepce a menstruačního cyklu.....	29
3. Cíle práce	33
4. Materiál a metodika	34
4.1 Vzorky	35
4.1.1 Typizace MHC	35
4.1.2 Fotografie	37
4.1.3 Hlasové nahrávky	39
4.1.4 Pachové stimuly	40
4.2 Testování.....	41
4.2.1 Podmínky testování	42
4.2.2 Uspořádání vzorků	43
4.2.3 Hodnocení	45

4.3	Analýza dat	46
5.	Výsledky	49
5.1	Celková atraktivita	49
5.2	Atraktivita pachu	50
5.3	Atraktivita tváře	51
5.4	Atraktivita hlasu	53
5.5	Vliv pořadí testování	60
6.	Diskuze	62
7.	Závěr	69
	Použitá literatura	70

1. Úvod

Tato práce se zabývá tématem partnerských preferencí, konkrétně hodnocením atraktivity fyzických znaků mužů ze strany žen. Výběr vhodného partnera je pro přežití dalších generací klíčový a jedním z aspektů, které mohou vybírající ženu zajímat, jsou geny MHC. Jelikož MHC geny úzce souvisí s imunitním systémem (Janeway 1993), hrají roli jak z pohledu zdravotního stavu potenciálního partnera, tak i z pohledu zdraví a vitality potomků. Dá se říci, že širší spektrum MHC genů přináší lepší obranyschopnost organismu (Carrington *et al.* 1999). Z tohoto důvodu předpokládáme, že jedinci s heterozygotními alelami MHC genů budou zdravější a také jako partneři atraktivnější.

V této studii se zaměřujeme na to, zda atraktivita pachu, tváře a hlasu potenciálního partnera souvisí s heterozygotností jeho MHC genů. Zároveň nás zajímalo, zda se nějak mění hodnocení této atraktivity během menstruačního cyklu ženy. Menstruační cyklus ženy můžeme rozdělit na dvě fáze – folikulární, kdy je hladina hormonů progesteronu a estrogeneru nízká, a luteální, kdy je tato hladina zvýšená. Pokud však žena užívá hormonální antikoncepci, k těmto změnám nedochází, neboť hormonální antikoncepce neumožní pokles koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru, který je typický pro folikulární fázi cyklu. Studie, zabývající se změnami preferencí vzhledem k podobnosti HLA genů potenciálních partnerů, ukazují na jiné preference u žen s přirozeným cyklem (kdy hodnocení většinou probíhalo ve folikulární fázi cyklu) a u žen, které užívají hormonální antikoncepci. My jsme se rozhodli ženy testovat dvakrát. Všechny ženy hodnotily vzorky jak v luteální, tak ve folikulární fázi cyklu. Zatímco u žen cyklujících jsme očekávali rozdílné vnímání atraktivity v závislosti na konkrétní fázi cyklu, ženy užívající hormonální antikoncepci fungovaly jako kontrolní vzorek a žádné změny v hodnocení jsme u nich neočekávali.

2. Teoretický přehled

2.1 Pohlavní výběr a kvalita organismu

S myšlenkou, že na jedince by mohl kromě přirozeného výběru působit ještě výběr pohlavní, přišel již Charles Darwin v roce 1871 (Darwin 1871). Zatímco u přirozeného výběru se jedná o selekční tlak ze strany prostředí a životních podmínek, u pohlavního výběru jde o tlak ze strany potenciálních sexuálních partnerů. Jeho síla pak tudíž závisí na míře kompetice o partnery (Barrett *et al.* 2001).

Během reprodukce neusiluje organismus pouze o vytvoření co největšího počtu potomků, podstatné je rovněž, aby se tito potomci dožili dospělosti a sami se dál rozmnožili. Je tedy důležité zplodit potomky s kvalitním partnerem. Kvality partnera mohou být jednak genetického rázu a jednak rázu sociálního, kam patří například ochota a schopnost pomáhat při péči a výchově potomků.

U savců investuje do potomstva výrazně více samice, a právě ta si v drtivé většině případů vybírá partnera a tím pádem i geny pro své potomstvo. Pokud dokáže získat samce s dobrými geny, může zajistit lepší životaschopnost svých potomků a následně i zvýšit cenu těchto potomků pro jejich budoucí potenciální partnery. Mají-li tyto geny navíc přímý vliv na zdravotní stav jedince, mohou samici zajistit i lepší péči o potomstvo ze strany vybraného partnera. Lze totiž předpokládat, že zdravější samec bude schopný sehnat více potravy, lépe potomky ubránit atd.

Mezi geny, které souvisí se zdravotním stavem a mohly by tak mít přímý vliv na kvalitu potomků i partnera, patří i geny MHC.

2.2 Co jsou geny MHC

Hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex, zkr. MHC) je rozsáhlý, vysoce polymorfní chromozomální úsek genů obratlovců, zkoumaný především u hlodavců, hrabavých ptáků a některých druhů ryb. U člověka byl kompletně osekvenován v roce 1999. U lidí se MHC geny nacházejí na šestém chromozomu a jsou nazývány zkratkou HLA (z angl. human leukocyte antigens). Glykoproteiny, exprimované na základě MHC genů, byly objeveny v souvislosti s prováděním transplantací. Ukázalo se, že u geneticky odlišných zvířat

byl transplantát častěji odmítán než u zvířat příbuzných. Proteiny na povrchu membrán, které toto odmítnutí transplantátu způsobují, byly nazvány allo-antigeny, později pak proteiny hlavního histokompatibilního komplexu.

Úsek MHC genů hraje důležitou roli při imunitních reakcích organismu. Díky němu mohou být v těle produkovány transmembránové MHC glykoproteiny I. a II. třídy, které jsou zodpovědné za rozeznávání bílkovin a jiných částic cizího původu (Janeway 1993, Penn & Potts 1999).

2.2.1 Princip fungování MHC genů

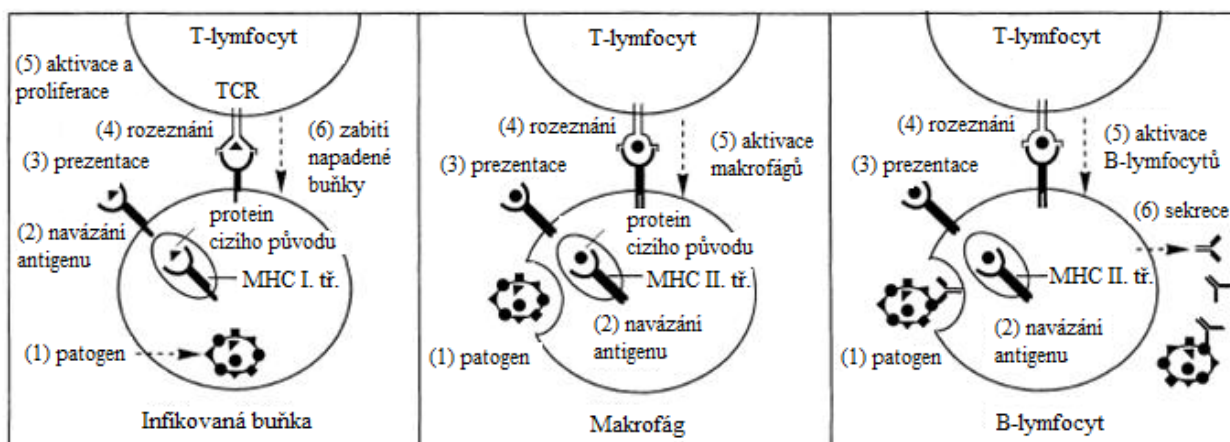
Pokud je organismus napaden patogenem, může imunitní systém reagovat pomocí antigen specifické odpovědi, která vede k proliferaci B a T lymfocytů a k tvorbě protilátek. Princip této specifické imunitní odpovědi spočívá v tom, že imunitní buňky specificky rozeznávají antigeny, které nejsou tělu vlastní. Výhodou specifické imunity je především rychlost reakce, která vzrůstá s četností kontaktu imunitní buňky s daným antigenem.

MHC proteiny mají za úkol pomáhat především při specifické imunitní reakci organismu (Janeway 1993). Právě ony dokáží rozeznat, co je, a co není v organismu původní. Dokáží to díky své extracelulární doméně zvané „oblast rozpoznávající antigen“. Jedná se o specifickou část proteinu, která váže krátký peptid vznikající degradací antigenu.

Jak již bylo uvedeno, existují MHC geny dvou tříd (Penn & Potts 1999). MHC I. třídy, které se vyskytují na povrchu všech jaderných buněk těla, a MHC II. třídy, které se vyskytují pouze u antigen prezentujících buněk (např. makrofágy). Ačkoli se oba typy MHC proteinů skládají ze dvou řetězců, liší se strukturou i funkcí. MHC třídy I. umožňují odhalit především napadení vnitrobuněčnými patogeny, jako jsou například viry. Každý organismus zná svou neměnnou sadu MHC proteinů I. třídy a právě změny ve struktuře prezentovaných proteinů mají za následek rozeznání viru. Dá se tedy říci, že geny MHC I. třídy prezentují i proteiny tělu vlastních buněk, a tak brání autoimunitní reakci. Naproti tomu MHC třídy II. detekují extracelulární patogeny, jako jsou například bakterie a helminti. Sada MHC II. třídy je proměnná, díky nim buňky prezentují na svůj povrch „vzorek“ patogenního mikroorganismu. Proteiny obou tříd jsou však vysoce polymorfní a oba hrají důležitou roli při prezentaci antigenu T-lymfocytům (Janeway 1993).

Mezi T-lymfocyty můžeme rozlišit dva typy, které jsou důležité pro imunitní reakce, do nichž se zapojují MHC proteiny – cytotoxické T-lymfocyty a pomocné T-lymfocyty. Cytotoxické i pomocné T-lymfocyty mají stejný základní receptor TCR sloužící k navázání a rozeznání MHC-antigen komplexu. Cytotoxické T-lymfocyty rozeznávají MHC I. třídy. Pokud na nich naleznou změny ve struktuře způsobené například vlivem virů, navodí apoptózu. Pomocné T-lymfocyty rozeznávají MHC II. třídy. Jestliže je antigen pomocnými T-lymfocyty rozeznán, dochází k aktivaci makrofágů nebo B-lymfocytů, které následně patogen fagocytují nebo eliminují specifickými protilátkami.

Infikovaná buňka tedy prezentuje T-lymfocytům pomocí MHC proteinů intracelulární peptid vzniklý degradací antigenu. Tím dojde k rozeznání patogenu a tato informace umožní specifickou imunitní odpověď (Obr. 1). Využití MHC proteinů I. třídy vede k proliferaci cytotoxických T-lymfocytů a následnému zabití napadené buňky a s ní i patogenu. V případě extracelulárních patogenů a parazitů jsou buňkou využity MHC II. třídy, dochází k prezentaci antigenu pomocným T-lymfocytům a následně se zapojí makrofágy nebo B-lymfocyty. Právě proto hrají MHC proteiny klíčovou roli v imunitním systému (Apanius *et al.* 1997).



Obr. 1 Hlavní funkcí MHC proteinů je prezentovat cizí antigeny T-lymfocytům a tím umožnit specifickou imunitní reakci organismu. MHC I. třídy prezentují protein cizího původu cytotoxickým T-lymfocytům, které mohou následně navodit apoptózu. MHC II. třídy prezentují „vzorek“ patogenního organismu pomocným T-lymfocytům, které mohou následně aktivovat makrofágy a B-lymfocyty (podle Penn & Potts 1999).

To, že MHC proteiny aktivují imunitní odpověď T-lymfocytů, potvrzují i nedávno publikované studie (Jiang & Fares 2010, Li & Raghavan 2010). Li a Raghavan se například ve

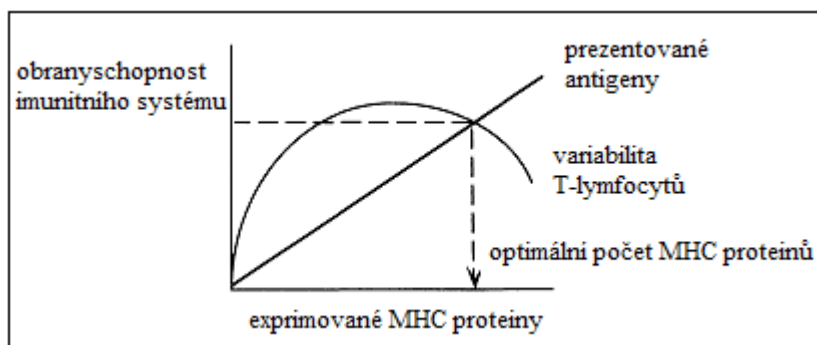
své práci zabývali především aktivizací T-lymfocytů CD8 a CD4, které jsou zodpovědné za odmítnutí transplantovaných tkání (Li & Raghavan 2010).

2.2.2 Polymorfismus

MHC geny jsou nejpolymorfnějšími geny obratlovců (Zelano & Edwards 2002) a právě tento polymorfismus je klíčový pro rezistenci organismu vůči infekcím (Hill 1999). Vysoký stupeň polymorfismu je udržován především pomocí tří mechanismů (Penn 2002). Prvním je tzv. frekvenčně závislá selekce, druhým pak pohlavní výběr a dále můžeme také uvažovat o nespecifické selekci.

MHC geny by teoreticky mohly být ještě variabilnější, nicméně reálně nejsou. Zdá se, že nižší variabilita je způsobena negativní selekcí T-lymfocytů, která probíhá v brzlíku, kam se brzy pro svém vzniku v kostní dřeni T-lymfocyty přesouvají. Během svého vývoje jsou T-lymfocyty selektovány dvakrát. Nejdříve dojde k vyřazení všech, které se špatně vážou na MHC proteiny a tudíž nejsou schopné je rozeznat. Následně probíhá negativní selekce, při níž jsou T-lymfocytům nabízeny organismu vlastní antigeny a vyřazeny jsou všechny T-lymfocyty, které na tyto vlastní antigeny reagují. Tato selekce minimalizuje riziko pozdější autoimunitní reakce, kterou by takový T-lymfocyt, likvidující vlastní nenapadené buňky, vyvolal (Penn & Potts 1999).

Kdyby tedy jedinec exprimoval velké množství různých MHC proteinů a ty by následně byly během negativní selekce předkládány T-lymfocytům, docházelo by k vyřazení velkého množství různých T-lymfocytů, což by v závěru nemuselo být výhodné (Obr. 2).



Obr. 2 Výsledná hladina polymorfismu MHC genů je nižší než maximální, neboť by během negativní selekce v brzlíku jinak docházelo k přílišnému snižování variability T-lymfocytů. Obrázek znázorňuje, jak větší variabilita MHC proteinů (osa x) způsobuje pokles variability T-lymfocytů a tudíž horší imunitní systém (osa y) (podle Penn & Potts 1999).

2.2.3 Mechanismy vzniku polymorfismu

Byly navrženy následující mechanismy, kterými lze vysokou variabilitu MHC genů vysvětlit:

1. frekvenčně závislá selekce
2. pohlavní výběr (kam patří hypotéza výhody heterozygotů a zábrany inbreedingu)
3. nespecifická selekce

add 1. Frekvenčně závislá selekce

Frekvenčně závislá selekce úzce souvisí s hypotézou Červené královny. Příkladem fungování této hypotézy je koevoluce mezi neustále se vyvíjejícím hostitelem a parazitem. V každé populaci se vždy vyskytuje nějaká momentálně výhodná alela, která chrání svého nositele proti útoku určitého parazita. Zpočátku je tato alela vzácná. Jak jsou ale jedinci s touto alelou favorizováni a parazit oslabuje jedince, kteří tuto alelu nemají, stává se častější. V populaci následně vzrůstá počet jedinců, kteří jsou vůči parazitovi imunní. Ochranná alela se posléze stává běžnou a následně může dojít k tomu, že se na ní parazit specializuje. Díky tomu, že probíhají zároveň změny na straně parazitů, se u parazita může objevit mutace, která mu umožní překonat nyní už běžnou ochrannou alelu. Proti takovému parazitovi se hostitelé se sledovanou běžnou alelou nejsou schopni bránit. Frekvence nového parazita v populaci stoupá, selekční tlak působí, dokud se opět neukáže jako výhodná jiná, dosud málo početná, alela, která stoupající počty parazita zastaví. Jak se tato alela v populaci rozšíří, opět poklesne frekvence výskytu parazita. Tento cyklus se tak v následujících generacích opakuje. Silná asociace mezi MHC alelami a parazitem, kdy můžeme pozorovat podobný cyklus koevoluce hostitel-parazit, byla sledována například u lososů obecných (*Salmo salar*). V populaci juvenilů, která byla nakažena bakterií *Aeromonas salmonicida*, přežili právě jedinci s určitým typem MHC alel (Langefors *et al.* 2001). Vysoká variabilita MHC alel se tedy udržuje tím, že se neustále mění selekční výhody jednotlivých alel.

S frekvenčně závislou selekcí souvisí i preference pro vzácné alely (Penn 2002). Výhoda nositelů vzácné alely předpokládá přímý vliv parazita na přežívání daného jedince. Pokud se náhle změní podmínky nebo tlak ze strany parazita (například vniknutím nového parazita do dané populace), mohou být prudce zvýhodněni nositelé vzácných alel. Tito nositelé zmíněné alely

dosud nepotřebovali, náhle jsou ale jejich prostřednictvím schopni optimálně reagovat na změněné podmínky okolí.

add 2. Pohlavní výběr

Jak již bylo řečeno, výběr partnera může mít zásadní vliv na přežívání potomků a jejich následnou reprodukci. Schopnost pružně reagovat na neustále se měnící selekční tlak (jakým je například výše zmíněná koevoluce hostitelů a parazitů) je jednou ze základních výhod sexuální reprodukce (Wedekind *et al.* 1995).

Byly vysloveny dvě hypotézy, vysvětlující, proč by MHC geny mohly ovlivňovat pohlavní výběr (Wedekind *et al.* 1995):

1) Výhoda heterozygotů

Vzhledem k principu fungování MHC se dá předpokládat, že jedinec heterozygotní v MHC genech bude schopen prezentovat větší variabilitu antigenů než homozygot. Výsledkem bude účinnější imunitní odpověď a obrana proti širšímu spektru patogenů (Carrington *et al.* 1999). Tím získává heterozygotní jedinec výhodu lepšího imunitního systému (Potts & Wakeland 1990).

Výhoda heterozygotů souvisí také s kodominancí alel MHC genů (Apanius *et al.* 1997). Pro snadnější představu si vezmeme příklad, kdy jsou oba rodiče homozygotní (alely AA a BB) a jejich potomci heterozygotní (alely AB). Jsou-li geny kodominantní, tj. projeví se obě alely stejně silně, pak je na tom heterozygot lépe než homozygot s alelami B, ale hůře než homozygot s alelami A. Dá se tedy říci, že při kodominantním vztahu je lepší být homozygotem s vhodnými alelami, které přináší svému nositeli nějakou objektivní výhodu. Na druhou stranu je ale „výhodnost“ konkrétních alel velmi proměnlivá.

*2) Zábрана inbreedingu (Brown & Eklund 1994, Potts *et al.* 1994)*

Vzhledem k tomu, že se MHC geny mohou projevit ve fenotypu a mají vysokou variabilitu, mohou usnadnit rozeznávání příbuzných jedinců. Pomocí pachu živočichové mohou MHC odlišného (nebo podobného) jedince snadno určit a vyhodnotit tak pravděpodobnou příbuznost. Toto zjištění se následně může etologicky projevit ve třech aspektech. Za prvé, blízcí příbuzní jedinci jsou nevhodní jako sexuální partneři, za druhé, blízcí příbuzní jedinci mohou být

upřednostňování, pokud se jedná o altruismus nebo kooperaci, a za třetí, samci odlišní od předchozího partnera mohou samici přivodit potrat už pouze svým pachem (jev známý jako efekt Bruceové) (Brown & Eklund 1994).

Rychlé rozlišení příbuzného jedince tudíž může zabránit inbreedingu, což je obzvláště vhodné v kontaktních populacích (např. u myši). Pro to, že je možné rozlišit příbuzné jedince na základě podobných genů MHC a následně rychle rozhodnout o spolupráci a altruismu, pak mluví fakt, že reakce mozku ženy na pach jiné ženy s podobným spektrem MHC proteinů, je rychlejší než reakce na pach MHC ženy se zcela odlišným zastoupením MHC proteinů (Pause *et al.* 1999). Na druhou stranu ale příliš vysoká variabilita MHC alel jedince, ke které by u potomků vedl vysoký outbreeding samice, může vést rovněž ke snížení obranyschopnosti imunitního systému, a to kvůli negativní selekci v brzlíku. Jak již bylo řečeno, zdá se, že maximální úroveň MHC variability není nutně nejvýhodnější (Nowak *et al.* 1992).

add 3. Nespecifická selekce

Nespecifická selekce je logickým vyústěním principu fungování MHC genů. Pokud mají MHC geny vliv na imunitní systém a tudíž na zdravotní stav jedince, může samice jednoduše preferovat samce zdravější a silnější, tedy s takovými MHC geny, které optimálně vyhovují daným ekologickým podmínkám a lépe odpovídají na případné parazitické infekce (Penn & Potts 1999). Samičí preference tedy nesouvisí primárně s MHC geny, pouze se odrazí výběr zdravých partnerů rovněž v MHC genech. Bude-li například heterozygot na základě větší pestrosti MHC genů opravdu zdravější, dojde k preferenci heterozygotů právě z tohoto důvodu.

2.2.3.1 Výhody pro jedince a výhody pro potomky

Selekce skrz pohlavní výběr může přinášet dva typy výhod – přímé a nepřímé zisky (Zelano & Edwards 2002). V případě MHC genů se jedná o přímé zisky vztahující se přímo k rodičům, například v podobě lepší schopnosti ubránit teritorium nebo obstarat potravní zdroje, zdravější partner bude také schopen lépe pečovat o potomky. Z nepřímých zisků pak můžeme očekávat zvýšenou životaschopnost mláďat a geneticky různorodější potomstvo, což je výhodné, neboť i při změně podmínek se alespoň část potomstva dokáže přispůsobit a přežije. Z těchto důvodů bychom teoreticky mohli očekávat, že si samice budou vybírat samce s ohledem na jejich MHC geny a momentální ekologický tlak (např. ze strany parazitů). Bude-li nositel vhodné alely

zdravější a odolnější, zdědí pravděpodobně tuto výhodu i jeho potomci. Navíc se takový jedinec dokáže více podílet na péči o potomstvo, a to právě díky svému lepšímu zdravotnímu stavu.

V souvislosti s pohlavním výběrem se objevuje výhoda heterozygotů (Potts & Wakeland 1990). Pokud by heterozygoté měli v boji s patogeny výhodu, byli by preferovanější jednak jako nositelé tzv. dobrých genů a jednak pro lepší momentální zdravotní stav. Přímou výhodou pro nositele je tudíž výkonnější imunitní systém, který se následně přenese i na potomstvo.

V případě inbreedingu by se také množily případy homozygotních jedinců, u kterých se snáz projeví recesivní letální či škodlivé alely (Apanius *et al.* 1997). Výběr partnera s ohledem na MHC geny, který by napomáhal zabraňovat inbreedingu, by tedy přinášel výhody především potomstvu, u něž by vlivem inbreedingu mohlo docházet k oslabení nejen imunitního systému.

Vhodné kombinace MHC genů pro dané podmínky přináší jedinci výhodu také při nespecifické selekci, kdy jedinec zdravější zanechá více potomků a bude preferovanější jako partner, ačkoli tyto preference nebudou přímo ovlivněné MHC geny.

Preference pro vzácné alely může potomkům umožnit přežít náhlé změny selekčního tlaku, neboť právě oni ponесou onu vzácnou alelu, která může například poskytovat imunitu proti invaznímu parazitovi (Penn 2002). Samozřejmě, že tuto výhodu pocítí v případě změny podmínek i rodič, nositel této alely.

2.3 Projev MHC

Abychom mohli uvažovat o vlivu MHC genů na výběr partnera, musí se MHC geny nějak projevit navenek. Dosavadní studie pracují především se dvěma aspekty, podle kterých by se preference mohly utvářet. Jedním z nich je pachová identita jedince, která může mít na preference vliv skrz olfaktorickou komunikaci, druhým aspektem je pak atraktivita tváře.

2.3.1 MHC a pach

Ačkoli stále nevíme jistě, jak MHC geny mohou ovlivnit pach jedince, existuje několik hypotéz popisujících způsob, kterým se MHC v pachu může projevit (Penn & Potts 1998):

- 1) MHC molekuly by mohly pach ovlivňovat přímo. Nasvědčuje tomu fakt, že byly nalezeny v tělních tekutinách, např. v moči či potu (Wobst *et al.* 1998). Proti přímému rozeznávání MHC molekul čichem ale hovoří jejich poměrně velké rozměry (Havlíček & Roberts 2009).

- 2) Tělesný pach by mohl být ovlivněn peptidy, které jsou na MHC molekuly specificky vázány (tzv. peptidová hypotéza). Tuto hypotézu podporuje výzkum Manfreda Milinského z roku 2005 (Milinski *et al.* 2005) provedený na koljuškách tříostných (*Gasterosteus aculeatus*). Samicím koljušek byly nabízeny pachové signály od různých samců, z nichž některé byly obohaceny o peptidy, které se váží na MHC molekuly. Ukázalo se, že samice s chudým spektrem MHC genů preferovaly vodu s přidanými peptidy. Když byly následně peptidy modifikovány v místech, které se váží přímo na MHC protein, ukázalo se, že struktura peptidu hraje v reakci samice roli.

V jiné studii se ukázalo, že u myší dochází pomocí vomeronasálního orgánu k podobnému vnímání a rozlišení těchto peptidů, které se vážou na MHC molekuly (Kimoto *et al.* 2005). Studie Leiders-Zufall a kol. (Leinders-Zufall *et al.* 2004) konkrétně zaznamenala, že právě části molekul MHC I. třídy ovlivňují chování myší a jsou rozlišovány pomocí vomeronasálního orgánu. Následná studie ukázala, že MHC ligandy je možné vnímat i hlavním čichovým orgánem (Spehr *et al.* 2006). To je důležité především pro výzkum pachových preferencí u člověka, protože vomeronasální orgán je u něj zřejmě nefunkční. Ačkoli studie Monti-Blocha a kol. naznačuje, že bychom vomeronasální orgán přece jen při vnímání chemických signálů využívat mohli (Monti-Bloch *et al.* 2003).

- 3) Je možné, že MHC molekuly vážou složky, které se dají vnímat čichem vzniklé z prezentovaných peptidů při jejich degradaci a přenášejí je do apokrinních žláz (Havlíček & Roberts 2009).
- 4) MHC geny mohou také ovlivňovat pach nepřímo, a to tím, že mění spektrum symbiotických organismů jedince a určují tím jeho specifickou mikroflóru. Absence či naopak přítomnost některých mikroorganismů může pach následně ovlivnit. Pach totiž vzniká působením mikroorganismů v podpaží, kde tyto mikroorganismy metabolizují látky, které jsou produkovány apokrinními žlázami a jsou původně bez zápachu (Penn & Potts 1998).
- 5) Poslední vysvětlení kombinuje peptidovou hypotézu s teorií specifické mikroflóry. Vychází z principu, kdy MHC molekuly na sebe váží specifické peptidy, které ale

činí čichatelnými až jejich rozklad pomocí mikroflóry, specifikované MHC geny (Penn & Potts 1998).

2.3.2 MHC a tvář

Atraktivita tváře má na výběr partnera zásadní vliv (Roberts *et al.* 2005a, b), neboť je docela dobrým indikátorem zdravotního stavu. Z pohledu MHC nás zajímají především dva faktory – flukтуаční asymetrie a zdravý vzhled tváře. Právě tyto faktory totiž můžeme pozorovat navenek a do nich se výbava MHC genů může promítnout.

1) *Flukтуаční asymetrie* (zkr. FA)

Je jedním z fenotypických projevů genetické kvality. Jedná se o jakékoli odchylky od perfektní bilaterální symetrie (v tomto případě tváře). Míra flukтуаční asymetrie tváře odráží odolnost jedince vůči parazitům (Swaddle & Cuthill 1995) a reflektuje schopnost organismu vyrovnat se se stresovými a jinak nepříznivými podmínkami během ontogeneze (Thornhill & Møller 1997, Møller & Swaddle 1997, Thornhill & Gangestad 1999). Úroveň FA tváře může vypovídat o genetických kvalitách jedince, jak naznačují studie, které našly například korelaci FA s tělesnou výškou (Manning 1995) nebo s psychickými schopnostmi (Manning & Pickup 1998). Jiné studie, které pracovaly s fotografiemi tváří, u nichž byla pomocí grafického programu upravena míra FA, ukázaly, že atraktivita tváří vzrůstá s jejich symetrií (Little *et al.* 2001). Pokud byly tváře různě symetrické, ale měly stejně zdravě vypadající pleť, pak s klesající FA vzrůstala atraktivita těchto tváří (Perrett *et al.* 1999). Vyšší atraktivitu symetrických tváří potvrdila i studie Bernharda Finka a kol. (Fink *et al.* 2006), kdy tyto tváře byly hodnoceny i jako zdravější. Avšak dřívější studie (Swaddle & Cuthill 1995) ukázala opačné preference, kdy tváře s graficky zvýšenou symetrií, byly hodnoceny jako méně atraktivní. Sami autoři to vysvětlují tím, že pokud je tvář až příliš symetrická, patrně působí chladně a bez emocí.

2) *Zdravý vzhled tváře*

Rovnoměrné zbarvení pleti, zdravé zuby, pružná pokožka, jasné oči a lesklé vlasy jsou hodnoceny jako atraktivní a velice dobře signalizují celkový zdravotní stav (Thornhill & Gangestad 1999). Na pokožce se přitom velice snadno projeví nedostatečná obranyschopnost proti působícím patogenům a toxinům z vnějšího okolí, zdravá pleť je tedy jakousi vizitkou

schopného imunitního systému. Dá se tedy například očekávat, že jedinec heterozygotní v MHC genech bude také lépe odolávat například chronickým zánětům pokožky a jiným opakujícím se zdravotním komplikacím a jeho tvář bude mít zdravější vzhled.

Také se ukazuje, že zdravá barva a vzhled pleti jsou k hodnocení atraktivity tváře dostačující bez ohledu na FA. To vedlo Jonese a kol. (Jones *et al.* 2004) k hypotéze, že příčinou vyšší atraktivity symetrických tváří je vlastně jejich zdravý vzhled, nikoli přímo nízká FA.

Hanne Lie a kol. (Lie *et al.* 2009) se zaměřili na souvislost mezi genetickou diversitou a zdravotním stavem jedince. Zatímco heterozygot má ve stejných lokusech na každém chromozonu jinou alelu, větší diversita znamená, že jedinec má obecně více typů alel. U 153 jedinců tedy Lie a kol. určili heterozygotnost a diversitu alel HLA genů i celkovou alelickou diversitu na 11 úsecích z 11 různých chromozomů (průměrně bylo zjištěno 14 alel v každém úseku). Následně monitorovali chřipkové příznaky u těchto jedinců po dobu čtyř měsíců. Jedinci s vyšší celkovou alelickou diversitou a s vyšší diversitou na HLA lokusu DRB1 vykazovali méně symptomů chřipky. Mezi celkovou heterozygotností (ať již HLA genů nebo ostatních otypizovaných lokusů) a zdravotním stavem nebyla naproti tomu nalezena žádná asociace.

2.4 Výběr partnera

Souvislost mezi MHC geny a výběrem partnera byla poprvé pozorována u myší, a to již v roce 1976. Yamazakiho studie (Yamazaki *et al.* 1976, Yamazaki *et al.* 1978) byly provedeny na zvířatech, která se lišila pouze v genech MHC. V této studii samci preferovali samice s odlišnými geny MHC. Následně pak byly nalezeny preference pro odlišné MHC geny i u jiných druhů. V případě Yamazakiho myší byl výsledek jasný, ale podíváme-li se na jiné studie, které byly uskutečněny na myších, zjistíme, že výsledky zdaleka tak jednoznačné nejsou (Tab. 1). Některé studie závislost preference na MHC dokazují, jiné naopak žádnou souvislost nenašly (Eklund *et al.* 1991). Tato nekonzistentnost platí, ať si vybírali samci samice (Yamazaki *et al.* 1976, Eklund *et al.* 1991) nebo si samice vybíraly samce (Eklund 1997a,b).

Preference v souvislosti s MHC geny					
	Partnerské preference		Pachové preference		Reference
	Samec	Samice	Samec	Samice	
Myš domácí					
1.	+				Yamazaki et al. 1976
2.	+				Yamazaki et al. 1978
3.	+				Yamazaki et al. 1988
4.	+	-			Beauchamp et al. 1988
5.	-				Eklund et al. 1991
6.		+		+	Egid and Brown 1989
7.		-			Manning et al. 1992a
8.		+			Potts et al. 1991
9.				+	Ninomiya and Brown 1995
10.		+			Eklund 1997a
11.		-			Eklund 1997b
12.		+			Penn and Potts 1998c

Tab. 1 Studie zabývající se preferencemi v závislosti na MHC genech jsou ve svých výsledcích nekonzistentní (podle Penn & Potts 1999). Tabulka znázorňuje sledované preference v jednotlivých studiích - zda se jednalo o preference ze strany samic či samců a zda byla souvislost pozorována (znam. +/-).

V roce 1995 pak uskutečnila skupina kolem Clause Wedekinda první výzkum hledající souvislost mezi MHC geny a partnerskými preferencemi u člověka (Wedekind *et al.* 1995). Jednalo se o hodnocení atraktivity pachu z triček, která měli otypizovaní muži na sobě dvě noci za sebou. Výsledkem byl pozorovaný posun preferencí k mužům s odlišným typem HLA genů, a to u žen, které neužívaly hormonální antikoncepci. U žen, které hormonální antikoncepci užívaly, došlo naopak k vyššímu hodnocení atraktivity mužů s podobným typem HLA genů.

2.4.1 Souvislost mezi MHC a výběrem partnera

Volba vhodného partnera je pro přežití potomstva klíčová. Vhodně zvolené MHC geny partnera mohou přinášet potomkům lepší obranyschopnost, vyšší diversitu a v neposlední řadě i lepší péči, obranu i potravní zdroje. Pro potomstvo je ideální, pokud se MHC geny rodičů vhodně doplňují a kombinují. Heterozygotnost pak může přinášet lepší imunitní systém a s ním větší životaschopnost.

U studia MHC alel a partnerských preferencí lze tedy sledovat dva možné aspekty:

- heterozygotnost MHC genů potencionálního partnera (např. Roberts *et al.* 2005a, Brown 1995, Thornhill *et al.* 2003)
- podobnost mezi MHC geny potencionálního partnera a jedince (např. Wedekind *et al.* 1995, Roberts *et al.* 2005b, Santos *et al.* 2005)

U člověka jsou v souvislosti s MHC geny sledované především aspekty atraktivity tváře a pachu. Mimo to také, jak se s ohledem na MHC geny tvoří dlouhodobé svazky. Předpokládáme, že pokud dochází k preferenci partnerů s odlišnými MHC geny, měly by se tvořit manželské páry, které jsou v MHC genech odlišnější než odpovídá náhodnému párování alel v populaci (Havlíček & Roberts 2009). Dosavadní studie se zabývaly vlivem podobnosti MHC genů na hodnocení atraktivity tváře a pachu a mírou sdílení alel v již vzniklých manželských párech. Dále také vlivem heterozygotnosti na atraktivitu tváře a pachu.

2.4.2 Heterozygotnost a atraktivita

Jak již bylo řečeno výše, vliv heterozygotnosti MHC alel na partnerské preference je možný, neboť heterozygotnost může mít své výhody. Předpokládáme proto, že samice při výběru mezi geneticky odlišnými samci podporuje vyšší míru heterozygotnosti u svých potomků (Brown 1995). Dominantní alela také může zabránit projevu letálních či škodlivých recesivních alel, heterozygotnost může mít pozitivní vliv při růstu, aktivitě i obranyschopnosti.

Genetická diversita jedince může hrát při hledání partnera roli, jak ukazuje i nedávno publikovaná studie od Hanne Lie a kol. (Lie *et al.* 2010a). Podle této studie ženy, které mají vyšší diversitu HLA genů, uváděly více sexuálních partnerů. Úspěšnost mužů při hledání sexuálních partnerek s heterozygotností jejich HLA genů však nijak nekorelovala.

Následující podkapitoly by měly být přehledem studií, které se zaměřují na rozdílné preference pro potencionálního partnera v závislosti na jeho heterozygotnosti nebo homozygotnosti v HLA alelách.

2.4.2.1 Atraktivita pachu

Jak se heterozygotnost podepíše na atraktivitě pachu, zkoumal například Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003). Během tohoto výzkumu účastníci hodnotili atraktivitu pachu

z bavlněných triček, v nichž testovaní jedinci spali dvě noci za sebou. Bylo hodnoceno 56 pánských a 48 dámských triček na desetistupňové škále a vzorky následně hodnotilo 77 mužů a 65 žen, které nebraly hormonální antikoncepci. Heterozygotnost byla hodnocena na HLA lokusech A, B a DR β . Byla zjištěna pozitivní korelace mezi heterozygotností lokusu B u mužů a jejich atraktivitou pro ženy. Tato preference se měnila během menstruačního cyklu ženy – nejvýraznější byla mimo fertilní fázi cyklu. U žen, jak je hodnotili muži, žádná signifikantní korelace mezi heterozygotností a atraktivitou objevena nebyla.

Další studii provedl Claus Wedekind se svou výzkumnou skupinou (Wedekind *et al.* 2006). Vzhledem k tomu, že již předchozí studie, které pracovaly s podobností MHC genů, signalizovaly možnou negativní korelaci mezi intenzitou pachu a jeho příjemností, zaměřili se autoři této studie na možnou souvislost mezi intenzitou a heterozygotností. Ve své studii využili vzorky od 38 mužů, kteří opět nosili po dvě noci za sebou bílá bavlněná trička. Otypizování HLA genů proběhlo na lokusech A, B a DR, 17 mužů bylo homozygotních alespoň v jednom lokusu. Pach byl hodnocen ženami a pachové vzorky byly rozděleny na skupinu od mužů s podobnými a skupinu od mužů s odlišnými HLA geny. Pach homozygotních mužů byl hodnocen jako více intenzivní ženami, které měly odlišné HLA geny. U žen s podobnými HLA geny žádný signifikantní rozdíl v hodnocení intenzity pozorován nebyl. Je tedy možné, že by atraktivita homozygotních mužů byla negativně hodnocena z důvodu příliš intenzivního pachu vzorků, který byl pro ženy s odlišnými HLA geny více cizí.

Intenzita signálu by ale podle Zahaviho handicapové teorie (Zahavi 1975) mohla být známkou dobrého zdravotního stavu, neboť intenzivnější signál je náročnější a dražší. Zrovna tak by ale nepříjemný pach mohl být vnímán jako intenzivnější bez ohledu na reálné množství uvolněných čichatelných složek, ale jen díky své nepříjemnosti. Je také možné, že kvalitní složky pachu mají být příjemnější a z toho důvodu méně intenzivní (Wedekind *et al.* 2006).

2.4.2.2 Atraktivita tváře

Jak bylo řečeno výše, souvislost mezi atraktivitou tváře a heterozygotností MHC genů se nabízí přes flukтуаční asymetrii tváře a zdravý vzhled pokožky. Závislost vyšší atraktivity tváře na nízké hladině flukтуаční asymetrie potvrdil ve své studii např. Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003). Pokud by heterozygotnost MHC komplexu způsobovala nižší flukтуаční asymetrii a zdravější pleť, pak by se u heterozygotů dala očekávat vyšší atraktivita tváře.

První výzkum, sledující souvislost atraktivity tváře a heterozygotnosti HLA genů, podnikl Craig Roberts a kol. (Roberts *et al.* 2005a). Studie se zúčastnilo 92 mužů, u kterých byly pomocí PCR otypizovány alely HLA -A, -B a -DRB1. Vzhledem k tomu, že jen malý počet mužů byl homozygotní ve více jak jedné alele, byli v této studii všichni muži, kteří byli homozygotní alespoň v jedné alele, zahrnuti do jedné skupiny. Fotografie tváří byly standardizovány a hodnoceny celkem 50 ženami, které byly během hodnocení ve folikulární fázi cyklu. Bylo zjištěno, že tváře heterozygotních mužů jsou hodnoceny jako atraktivnější. Pokud se zohlednila i podobnost HLA genů hodnotící ženy, pak míra atraktivity hodnocených vzorků závisela na počtu sdílených alel. Zajímavé bylo, že pokud se podíváme na flukтуаční asymetrii těchto tváří, nijak její míra s heterozygotností nekorelovala. Zato byla nalezena pozitivní korelace u jiného projevu HLA ve tváři - tváře heterozygotů byly hodnoceny jako zdravější.

Další studii na toto téma uskutečnili Hanne Lie a kol. (Lie *et al.* 2007). V této práci figurovalo 77 mužů a 77 žen, u nichž bylo otypizováno 12 markerů, mezi nimi i HLA -A, -B, -DRB1 lokusy. Každá ze 77 fotografií tváře byla hodnocena 30 lidmi opačného pohlaví. Výsledkem byla pozitivní korelace mezi heterozygotností a atraktivitou tváře mužů, kdy ženy hodnotily heterozygotní muže jako atraktivnější. Zajímavé je, že tato korelace vyšla pouze v případě HLA genů, nikoli v případě jiných markerů a navíc vyšla pouze při hodnocení mužů ženami, obráceně se žádná souvislost neprojevila.

Třetí dosud publikovaný výzkum, který probíhal v jižní Africe, provedli Vinet Coetzee a kol. (Coetzee *et al.* 2007). V této studii se autoři kromě atraktivity zaměřili i na zdravotní stav. Hodnocení probíhalo na 59 fotografiích tváří žen (otypizovaných v lokusech HLA -A a -B), které hodnotilo 59 mužů. Mezi heterozygotností a atraktivitou zde nebyla zjištěna žádná závislost, hodnocení však probíhalo pouze ze strany mužů, kde závislost neukázala ani studie Lie a kol (Lie *et al.* 2007). Heterozygotní ženy nebyly hodnoceny ani jako signifikantně zdravější oproti ženám homozygotním, ani sami sebe jako zdravější neuváděly.

V roce 2008 publikovala Lie a kol. (Lie *et al.* 2008) další studii, během níž bylo ohodnoceno 160 fotografií tváří. Účastníci měli otypizovány alely HLA, a mimo to i několik mikrosatelitů (tj. opakující se sekvence DNA). Ukázalo se, že právě HLA geny hrají důležitou roli při formování ženských preferencí, kdy ženy hodnotily tváře mužů heterozygotních v HLA genech jako atraktivnější. U mužů se preference v souvislosti s heterozygotností žen neprojevíly.

Výsledky dosavadních studií naznačují, že by se tyto výsledky lišily podle toho, zda hodnocení proběhlo z pohledu mužů nebo žen. Je možné, že ženy preferují heterozygotnější muže, zatímco muži žádné změny v preferencích s ohledem na HLA nemají (viz studie Roberts *et al.* 2005a, Coetzee *et al.* 2007, Lie *et al.* 2007, 2008).

2.4.3 Podobnost alel a atraktivita

Tato kapitola je stručným přehledem základních prací, které se zabývají atraktivitou partnera s ohledem na sdílení alel MHC. Sdílení alel odráží podobnost MHC komplexu, tudíž zde můžeme očekávat spíše preference posunuté ve prospěch jedinců s odlišným MHC systémem. Při párování jedinců podobných totiž dochází ke snížení variability MHC alel u potomstva a je vyšší riziko, že potomci budou homozygotní. U nich se pak snáze mohou projevit letální recesivní alely nebo celkově slabší imunitní systém.

2.4.3.1 Atraktivita pachu

První studií, která se zabývala podobností alel a atraktivitou pachu, byla studie Clause Wedekinda a kol. (Wedekind *et al.* 1995). V této studii bylo otypizováno 49 žen a 44 mužů v alelách HLA -A, -B, -DR. Každá žena hodnotila šest triček od mužů, z toho tři trička od mužů s podobnými HLA geny a tři od mužů s odlišnými HLA geny. Výsledkem této studie bylo zjištění, že ženy preferují spíše pach mužů s odlišnými HLA geny. Platí to ovšem jen u žen, které neužívají hormonální antikoncepci. Ženy, které hormonální antikoncepci užívají, preferují naopak pach mužů s HLA podobnými geny.

Následně pak publikovali Claus Wedekind a Sandra Füreš další studii na toto téma (Wedekind & Füreš 1997). Během výzkumu nechali 58 mužů a 63 žen ohodnotit šest triček, která předtím nosili čtyři muži a dvě ženy dvě noci za sebou. Typizace proběhla na lokusech HLA -A, -B a -DR. Ukázalo se, že ženy, které neužívaly hormonální antikoncepci, označily za příjemnější pach mužů s odlišnými HLA geny. Oproti tomu uživatelky hormonální antikoncepce pach hodnotily obráceně a preferovaly spíše muže s podobnými HLA geny (ačkoli tyto preference nesplňovaly podmínky signifikance). Zdá se tedy, že na hodnocení atraktivity pachu má vliv užívání hormonální antikoncepce (kap. 2.4.4).

Další výzkum uskutečnil v roce 2002 Jacob a kol. (Jacob *et al.* 2002). Během výzkumu hodnotilo šest triček od mužů 49 žen, které neužívaly hormonální antikoncepci. Ženy nehodnotily

přímo atraktivitu pachu, ale jeho příjemnost. Vzorky byly hodnoceny nejlépe v situaci, kdy ženy s hodnocenými muži sdílely střední množství alel. Muži s vyšším množstvím podobných alel byli ale hodnoceni lépe, než muži s nízkou mírou podobnosti. Hlavní kritika této studie se zaměřuje na nízký počet hodnocených pachů, neboť hodnocení mohlo být ovlivněno například vzácnými alelami. Ty by se na hodnocení mohly projevit a to by bylo ovlivněno jimi, nikoli mírou podobnosti MHC alel (Havlíček & Roberts 2009).

Na hodnocení příjemnosti (nikoli atraktivity) se ve svých studiích zaměřili také Eggert a kol. (Eggert *et al.* 1999), kteří sledovali podobnost HLA alel mezi přáteli. Podle jejich výzkumu, hodnotí ženy pach jiné ženy s podobnými HLA geny jako příjemnější než pach ženy s odlišnými HLA geny. U mužů je tento efekt slabší, ale dá se říci, že mezi přáteli stejného pohlaví dochází k preferenci pachu HLA podobných jedinců.

Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003) publikovali výsledky studie, kdy byl pach z triček hodnocen jak muži, tak ženami. Tohoto výzkumu se zúčastnilo 97 mužů a 100 žen. Hodnotili-li muži, vyšla pozitivní korelace mezi atraktivitou a vyšší mírou odlišnosti HLA genů ženy. Ze strany žen se žádné souvislosti mezi preferencemi a mírou sdílení alel neobjevily. Tyto výsledky jsou netypické, což lze vysvětlit vysokou mírou variability testovaného souboru, kdy účastníci měli poměrně široké věkové rozmezí (od 17 do 54 let) a pocházeli z různých etnických skupin.

Prvními, kdo nepoužili k hodnocení pachu trička, byli Santos a kol. (Santos *et al.* 2005). Místo triček byly použity vatové tampóny, které byly nošeny probandy pět dní ve váčku na hrudi, a navíc byly hodnoceny i pachové vzorky moči. Takto bylo testováno a vzájemně hodnoceno 29 žen a 29 mužů. Výsledkem bylo negativní hodnocení mužů s podobnými alelami HLA ze strany žen. Nevýhodou této studie je ale především to, že nebylo bráno v potaz užívání či neužívání hormonální antikoncepce, které může mít na hodnocení vliv (viz studie Wedekind *et al.* 1995, Wedekind & Furi 1997). Navíc hodnocení vzorků probíhalo čtyři dny, což mohlo mít na hodnocený pach také výrazný vliv.

Studie Craiga Robertse a kol. (Roberts *et al.* 2008), které se zúčastnilo 193 žen (z nich 97 se zúčastnilo obou sezení) a 97 mužů, byla založena na dvou sezeních, neboť se zaměřovala primárně na změnu v hodnocení atraktivity vlivem hormonální antikoncepce. Během prvního sezení byly všechny ženy ve folikulární fázi cyklu a žádná z nich neužívala hormonální antikoncepci. Během druhého sezení již část žen hormonální antikoncepci užívala. K hodnocení již byly použity vatové tampóny, které měli probandi nalepené v podpaží, a vzorky byly

vyhodnoceny pouze ženami. Během prvního ani druhého sezení nebyl nalezen žádný efekt míry podobnosti HLA genů na hodnocení atraktivity. Tato studie byla ale první, která se zajímala přímo o problematiku hormonální antikoncepce.

2.4.3.2 Atraktivita tváře

Souvislostí mezi atraktivitou tváře a mírou sdílení alel mezi hodnotícím a hodnoceným jedincem se dosud zabývaly pouze tři studie (viz. Thornhill *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2005b, Lie *et al.* 2010b).

Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003) uskutečnili první studii, která se kromě souvislostí atraktivity a heterozygotnosti (viz výše) zabývala vnímáním atraktivity tváře a podobností HLA genů. Ve své studii nenalezli žádnou korelaci mezi hodnocením atraktivity tváře a mírou sdílení alel.

K jinému výsledku dospěli v roce 2005 Craig Roberts a kol. (Roberts *et al.* 2005b). V tomto případě hodnocení probíhalo pouze ze strany žen, které byly ve folikulární fázi cyklu. Výzkumu se účastnilo 75 mužů a 92 žen, z nichž každá žena hodnotila šest fotografií tváří mužů, tři s podobnými HLA alelami a tři s odlišnými, a to v kontextu dlouhodobého a krátkodobého vztahu. V obou kontextech byly tváře mužů, se kterými hodnotící ženy sdílely více alel, hodnoceny jako atraktivnější. Tento trend je opačný, než jaký se objevoval u hodnocení atraktivity pachu. Je možné, že opačné preference u těchto dvou stimulů mohou ve svém výsledku vést ke střední hladině podobnosti HLA genů.

Ve studii Lie a kol. (Lie *et al.* 2010b), které se účastnilo 32 žen a 47 mužů, bylo zjištěno, že počet sdílených alel HLA ovlivňuje preference ze strany mužů, nikoli ale ze strany žen. Muži preferovali tváře žen, s nimiž sdíleli méně alel, a to bez ohledu na kontext (např. jestli hodnotí atraktivitu potenciálního krátkodobého či dlouhodobého partnera). V kontextu atraktivity krátkodobého partnera byly preference pro odlišné alely pozorovány i u jiných alel, než jsou alely HLA genů, ačkoli v tomto případě nebyl výsledek signifikantní. Na hodnocení atraktivity mužů nemělo sdílení HLA genů ani jiných typizovaných alel vliv. Preference pro odlišnost pozorovaná i u jiných než MHC genů nahrává teorii, že pozorované preference MHC genů jsou pouze důsledkem celkových preferencí odlišných genů (Chaix *et al.* 2008).

2.4.3.3 Dlouhodobé vztahy

Vliv MHC genů na partnerské preference by se měl projevit i na dlouhodobých vztazích a manželstvích, neboť pokud předpokládáme výběr partnera s odlišnými MHC geny, měly by manželské páry sdílet menší množství alel, než by sdílely při náhodném párování bez ohledu na MHC geny (Havlíček & Roberts 2009). Všechny studie, které se zabývají dlouhodobými vztahy, se zaměřují na sdílení alel, tj. podobnost genů MHC mezi partnery v daném manželském páru.

První studie na toto téma pochází od Rosenberga a kol. (Rosenberg *et al.* 1983). Tento výzkum se uskutečnil na 1017 párech, u kterých byly otypizované lokusy HLA -A a -B. Tento vzorek byl značně heterogenní, neboť výzkumu se zúčastnilo několik etnických skupin. Rosenberg zjistil, že v těchto párech partneři sdílejí překvapivě více alel HLA, než kolik by se dalo očekávat při náhodném párování takovéto populace. V tomto případě se ale pozorovaný jev dá vysvětlit i párováním, které bez ohledu na HLA probíhá primárně v rámci etnických skupin.

Trochu jinak k problematice přistupovali Nordlander a kol. (Nordlander *et al.* 1983) a Giphart a D'Amato (Giphart & D'Amato 1983). Ve svých studiích se zaměřili na to, zda se u partnerů vyskytují specifické alelické kombinace s vyšší pravděpodobností. Giphart a D'Amato (Giphart & D'Amato 1983) našli u tří tisíc holandských párů čtyři signifikantní asociace, kdy se v párech objevily specifické kombinace alel častěji než by odpovídalo náhodnému párování. Tento výsledek podporuje hypotézu, že na výběr partnera mají specifické alelické kombinace vliv. Oproti tomu Nordlander a kol. (Nordlander *et al.* 1983) u 100 manželských párů ze Švédska žádné podobné asociace ve své studii nenašli.

To, že výsledky těchto výzkumů nejsou jednoznačné, je zřejmé hned ze dvou studií z roku 1997. Hedrick a Black (Hedrick & Black 1997) mapovali situaci u amazonských indiánů, kde otypizovali 194 manželských párů (alely HLA -A, -B) z jedenácti různých kmenů. V této studii nezjistili jiné počty shodných alel u partnerů, než jaké by se daly očekávat u náhodně spárované populace a bylo tu jen velmi málo párů, kde by partneři měli výrazně odlišné alely.

Oproti tomu Ober a kol. (Ober *et al.* 1997) svou studii provedli na náboženské komunitě Hutteritů v Severní Americe, kteří se zdají být pro takový výzkum ideální. Neexistuje u nich totiž možnost rozvodu, nesmějí užívat hormonální antikoncepci a sňatky nejsou domlouvány rodiči. Bylo otypizováno 411 manželských párů v alelách HLA -A, -B, -C, -DR a -DQ a bylo zjištěno, že míra sdílení alel mezi partnery je signifikantně nižší, než jaká by se dala očekávat, kdyby páry vznikaly náhodně. Tento výsledek by tedy mluvil pro hypotézu, že párování skutečně probíhá

s ohledem na HLA geny. Obě studie ale byly zrealizovány na malých a inbredních populacích, s relativně nízkou mírou MHC diversity, což může být jejich nevýhoda, neboť neodpovídají běžné populaci.

V roce 2000 pak japonský tým kolem Yasua Ihary (Ihara *et al.* 2000) zrealizoval výzkum na 450 párech v Japonsku. Otypizoval partnery v lokusech HLA -A, -B, -C, -DR a -DQ. Míra sdílení alel v párech se ale nijak signifikantně nelišila od populace spárované náhodně.

Raphaëlle Chaix a kol. (Chaix *et al.* 2008) se zaměřili na populaci Nigérijců a Američanů, s tím, že analyzovali kromě HLA genů i genotyp. Analýzy tedy proběhly u 30 manželských párů z Nigérie a 44 párů z Utahu, kde u všech byl analyzován celkový genotyp a u 30 z nich HLA geny. Manželské páry v Nigérii nesdílely nijak odlišné množství HLA alel, než kolik by se dalo očekávat při náhodném párování. Na druhou stranu si ale partneři byli podobnější v celkovém genotypu, než kdyby párování odpovídalo náhodě. Naopak páry americké sdílely méně alel HLA než při náhodném uspořádání párů a tento efekt se projevil i na odlišnosti celkového genotypu. To opět navádí na myšlenku, že by odlišné MHC alely v páru byly pouze důsledkem výběru partnera s celkově odlišnými geny.

Se sdílením alel partnery souvisí i výzkum Kun Jin a kol. (Jin *et al.* 1995). V tomto výzkumu figurovalo 123 párů, u kterých se opakovaně objevily spontánní potraty a 76 párů, které měly problémy s neplodností. Frekvence alel HLA se u těchto párů signifikantně nelišila, avšak páry, které měly problémy se spontánními potraty, sdílely více alel v lokusu HLA -DR. Páry, u nichž se vyskytovaly problémy s neplodností, pak sdílely více alel v lokusu HLA -DQ. Autoři tedy přišli se zajímavou myšlenkou, že sdílení alel může vést k problémům s přirozeným početím potomka, která se následně potvrdila v další studii na toto téma (Beydoun & Saftlas 2005). Tato studie se zaměřila na spontánní potraty v rané fázi těhotenství. Ukázala, že MHC geny hrají důležitou roli pro úspěšné zahnízdění zárodku, při kterém je nezbytná adekvátní imunitní odpověď ze strany matky. Je-li u párů podobnost alel MHC genů vysoká, mohou být lymfocyty matky příliš slabě stimulovány antigeny otce, což může bránit právě úspěšnému zahnízdění zárodku na počátku těhotenství.

Christine Garver-Apgar a kol. (Garver-Apgar *et al.* 2006) se zaměřili na aspekt nevěry a sexuální spokojenosti partnerů v souvislosti s mírou sdílení alel HLA. Výzkumu se zúčastnilo 48 párů, z nichž žádná žena neužívala hormonální antikoncepci. Míra sdílení alel byla hodnocena na třech lokusech. Výsledkem bylo zjištění, že se zvyšující se podobností HLA alel jsou ženy

méně sexuálně aktivní a se svým sexuálním životem méně spokojené. Také se zvyšující podobností alel rostl počet mimopárových aktivit ze strany žen. Ze strany mužů tyto výsledky pozorovány nebyly.

2.4.4 Vliv antikoncepce a menstruačního cyklu

V průběhu menstruačního cyklu dochází ke změnám koncentrace hormonů v těle, především k poklesu hladiny progesteronu a estrogeneru ve folikulární fázi cyklu, kdy je žena před ovulací, tj. před dobou, kdy je pravděpodobnost početí nejvyšší. S tím souvisí změny v jejích partnerských preferencích, zvyšuje se aktivita při hledání partnera a předpokládáme i vyšší citlivost vůči jeho atraktivitě (Gangestad & Thornhill 2008). Princip hormonální antikoncepce je založen na stejných hormonech, kdy tato antikoncepce udržuje stálou vysokou hladinu progesteronu a estrogeneru, bez ohledu na fázi menstruačního cyklu. U žen, které užívají hormonální antikoncepci, tedy nedochází ke klasické folikulární fázi cyklu.

Teorii, že mohou být samičí preference ovlivněny změněnou hormonální hladinou, podporuje výzkum Egida a Browna (Egid & Brown 1989). V tomto výzkumu myši v estru trávily podstatně více času v blízkosti pachy MHC nepodobných samců než v blízkosti pachy MHC podobných samců. U myši v době mimo estrus žádné preference pozorovány nebyly. Samice myši také odchovávají svá mláďata mnohdy ve společných hnízdech a za partnery pro toto sdílení hnízd jsou preferenčně vybíráni jedinci s podobnými MHC geny.

U člověka se pozorovaná korelace mezi preferencemi pachy a mírou podobnosti HLA jedinců také mění, např. v závislosti na hormonální antikoncepci, a zdá se tedy, že by na ní mohl mít hormonální statut podobný vliv. Je možné, že pro vnímání atraktivity s ohledem na HLA geny je klíčové, v jaké hormonální situaci se hodnotící žena nachází (Jordan & Bruford 1998).

2.4.4.1 Vliv antikoncepce

Že by užívání hormonální antikoncepce mohlo pozměnit vnímání atraktivity potencionálního partnera, se projevilo již během prvního výzkumu, který se zaměřil na možnou souvislost mezi atraktivitou pachy a mírou podobnosti MHC genů (Wedekind *et al.* 1995). Posléze publikovali podobnou studii na toto téma Claus Wedekind a Sandra Füre (Wedekind & Füre 1997). V těchto studiích (kap. 2.4.2.1) bylo zjištěno, že ženy neužívající hormonální

antikoncepci preferují spíše pach mužů s odlišnými HLA geny a ženy, které naopak hormonální antikoncepci užívají, preferují spíše pach mužů s HLA podobnými geny.

První se na vliv hormonální antikoncepce cíleně zaměřili Craig Roberts a kol. (Roberts *et al.* 2008). Jeho studie byla založena na tom, že proběhla dvě sezení, kdy během prvního sezení všechny ženy, které hodnotily pachové vzorky, byly ve folikulární fázi cyklu. Během druhého sezení pak polovina z nich již hormonální antikoncepci užívala, a to po dobu tří měsíců. U žen, které začaly užívat hormonální antikoncepci, poklesly preference pro pach HLA odlišných mužů. U kontrolní skupiny naopak preference pro odlišnost vzrostly.

Tyto změny preferencí pod vlivem hormonální antikoncepce se dají vysvětlit tak, že hormonální antikoncepce navozuje v těle stejnou hormonální situaci, jaká se tvoří během těhotenství. A během těhotenství se zvyšuje vazba na příbuzné jedince, neboť ti případně s péčí o potomka pomohou (Wedekind *et al.* 1995). Vzhledem k tomu, že příbuzní často nesou podobné geny MHC, mohlo by tedy docházet k posunu preferencí ve prospěch jedinců s podobnými MHC geny.

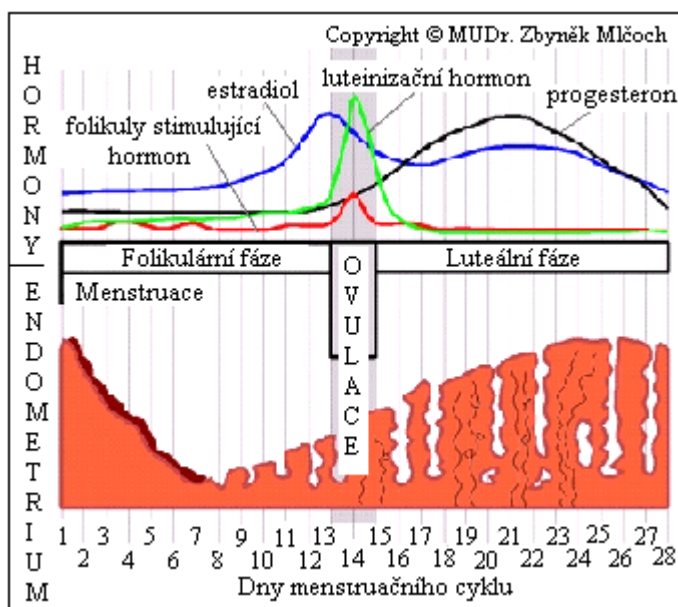
Další možné vysvětlení je přes preference heterozygotů. Je možné, že žena užívající hormonální antikoncepci jednoduše více preferuje heterozygoty. Heterozygot s ní bude ale pravděpodobně sdílet více alel a následně se to projeví jako preference MHC podobných genů (Roberts *et al.* 2006). S tím by souvisel i fakt, že Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003) našli ve své studii silnější preference pro heterozygoty v luteální fázi cyklu, kdy hormonální hladina více odpovídá hladině při užívání hormonální antikoncepce. Na druhou stranu, pokud mají partneři podobné MHC alely, ač heterozygotní, je vyšší pravděpodobnost výskytu stejných alel v gametách a zvyšuje se pravděpodobnost, že potomci budou homozygotní. Podobnost MHC alel může také vést k problémům s početím potomstva, které se projeví delšími meziporodními intervaly a častějšími potraty v rané fázi těhotenství (Beydoun & Saftlas 2005).

2.4.4.2 Vliv menstruačního cyklu

Během menstruačního cyklu ženy dochází k výkyvům hormonální hladiny, především se mění koncentrace progesteronu a estrogenu v těle (Obr. 3). Během folikulární fáze totiž dochází ve vaječniku k růstu folikulů, díky folikuly stimulujícímu hormonu neboli folitropinu, který je vylučován hypofýzou. Obaly vajíček ve folikulu následně produkují hormony estrogenu, z nichž nejvýznamnější je estradiol. Posléze se v těle začíná ve vyšší míře tvořit luteinizační hormon,

který umožní dozrání vajíčka ve folikulu a následnou přeměnu folikulu na žluté tělísko, které produkuje progesteron. Tento opakující se proces způsobuje zvýšenou hladinu progesteronu a estrogeneru v luteální fázi a naopak nižší hladinu těchto hormonů ve fázi folikulární.

Vzhledem k tomu, že hormonální antikoncepce funguje na principu zvýšení koncentrace estrogeneru a progesteronu v těle, nedochází u žen, které hormonální antikoncepci užívají, k poklesu hladiny těchto hormonů během folikulární fáze cyklu. Pokud má zvýšená hladina hormonů na partnerské preference vliv (kap. 2.4.4.1), můžeme očekávat i změny během přirozeného cyklu ženy, kdy by se daly předpokládat podobné preference u žen v luteální fázi cyklu a u žen užívajících hormonální antikoncepci. Odlišné preference bychom pak předpokládali u žen ve folikulární fázi cyklu.



Obr. 3 Změny hladiny hormonů během menstruačního cyklu ženy, kdy ve folikulární fázi cyklu jsou koncentrace hormonů progesteronu a estradiolu nižší než v luteální fázi. Hormonální antikoncepce tento pokles koncentrace hormonů neumožní. (podle Mlčoch 2010)

Změny v preferencích během cyklu už ukazují některé předchozí studie, které se netýkají MHC genů. Ženy ve folikulární fázi cyklu například preferují symetričtější tváře (Little *et al.* 2007) nebo pach dominantnějších mužů (Havlíček *et al.* 2005). Další studie ukázala, že v období kolem ovulace, během zvýšené hladiny luteinizačního hormonu, ženy častěji mívají sexuální fantazie a zájem o jiného, než primárního partnera (Gangestad *et al.* 2002). Tyto změny se dají vysvětlit jako silnější preference kvalitních genů v období, kdy je pravděpodobnost početí vyšší.

Claus Wedekind (Wedekind *et al.* 1995, Wedekind & Furi 1997) nechával ve svých výzkumech ženy hodnotit pachové vzorky vždy ve folikulární fázi cyklu, stejně tak i Craig Roberts (Roberts *et al.* 2008). Ve všech těchto studiích vycházely preference ve prospěch pachu mužů s odlišnými HLA geny. To by souhlasilo s teorií, že hladina progesteronu a estrogeneru (ať již ovlivněná hormonální antikoncepcí či menstruačním cyklem) může mít vliv na hodnocení atraktivity mužů s podobnými geny HLA.

Na změny během cyklu se zaměřila i Christine Garver-Apgar (Garver-Apgar *et al.* 2006), která ve své studii zjistila, že ženy sdílející se svým partnerem větší množství alel mají větší tendence k mimopárovým aktivitám a tyto tendence se projevují především ve folikulární fázi cyklu. Jinak řečeno, ve folikulární fázi cyklu jsou tyto ženy více přitahovány jiným mužem než svým partnerem, zatímco v luteální fázi nemá sdílení alel na toto chování signifikantní vliv.

Že se vnímání pachu během cyklu mění, dokazuje i další výzkum, během něhož byla snímána mozková aktivita při hodnocení pachu HLA podobných a odlišných mužů (Pause *et al.* 1999). Hodnocení proběhlo vždy třikrát, pokaždé v různé fázi cyklu a ukázalo se, že největší reakce mozku na pach se objevuje ve folikulární fázi cyklu, a to bez ohledu na podobnost HLA genů. Během ovulace pak poklesla reakce na pach mužů s odlišnými geny HLA (pach by tedy mohl být ohodnocen jako více neutrální), v luteální fázi byly zaznamenány mozkové stimuly nejmenší.

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda má heterozygotnost MHC genů vliv na atraktivitu pachového vzorku, fotografie tváře a nahrávky hlasu potencionálního partnera. Dále nás zajímalo, zda se hodnocení této atraktivity mění v průběhu menstruačního cyklu ženy. Testovali jsme tedy změny v hodnocení atraktivity heterozygotů a homozygotů během cyklu u žen užívajících hormonální antikoncepci a u žen, které přirozeně cyklují. Vzhledem k tomu, že opakování testování může mít na hodnocení vliv, byl testován a vzat v potaz i tento faktor.

U každého typu stimulu jsme si položili následující otázky:

1. Liší se atraktivita heterozygotů a homozygotů?
2. Dochází v průběhu menstruačního cyklu ke změnám preferencí s ohledem na heterozygotnost MHC genů?
3. Liší se hodnocení atraktivity heterozygotů a homozygotů u žen, které užívají hormonální antikoncepci a u žen přirozeně cyklujících?

První otázka směřuje k tomu, zda se celkově liší atraktivita homozygotů a heterozygotů. Vzhledem k předchozím studiím (viz např. Thornhill *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2005a), předpokládáme vyšší hodnocení atraktivity heterozygotů. Druhá otázka se zaměřuje na rozdíly dané fází menstruačního cyklu, kdy očekáváme vyšší hodnocení atraktivity heterozygotů ve folikulární fázi cyklu, kdy je žena vnímavější k atraktivitě potencionálních partnerů (Gangestad & Thornhill 2008). V luteální fázi pak očekáváme hodnocení nižší. U žen s hormonální antikoncepcí žádné rozdíly mezi „folikulární“ a „luteální“ fází cyklu neočekáváme, neboť zde k žádnému výkyvu v hormonální hladině nedochází. Hodnocení těchto žen tak považujeme za kontrolní vzorek. Také nás zajímalo, zda se liší hodnocení žen, které přirozeně cyklují a žen, které užívají hormonální antikoncepci. Odlišné hodnocení jsme očekávali především ve folikulární fázi cyklu, s tím, že u žen, které užívají hormonální antikoncepci jsme zde očekávali nižší hodnocení atraktivity.

4. Materiál a metodika

Výzkum probíhal od začátku roku 2009 do poloviny roku 2010, ve spolupráci s Ústavem hematologie a krevní transfúze (UHKT) na Karlově náměstí v Praze pod záštitou doc. MUDr. Zdenky Gašové, CSc.

Nábor účastníků výzkumu (dále probandů)

Oslovili jsme dárce krevních destiček a plné krve. Dárci byli osobně kontaktováni během čekání na odběr, informováni o výzkumu, a pokud měli zájem se jej zúčastnit, byl jim dán k podpisu informovaný souhlas. Při samotném odběru krve jim pak byl odebrán vzorek 2ml krve do standardní zkumavky pro nesrážlivou krev pro hematologii s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA). Za účast v experimentu byla mužům vyplacena odměna ve výši 400Kč, ženy pak za účast obdržely odměnu ve formě tabulky čokolády.

Soubor probandů

Celkem jsme kontaktovali 200 osob, z nichž bylo 80 mužů a 120 žen, tato čísla se ale během testování změnila na 51 mužů a 52 žen, neboť ne všichni se nakonec mohli zúčastnit testování. Po ukončení sběru vzorků jsme měli 51 otypizovaných mužů v průměrném věku 30,16 let (v rozmezí mezi 19 až 46 lety), od všech jsme získali fotografie tváře a náhrávky hlasů a od 49 z nich pachové vzorky.

Soubor hodnotitelek se skládal celkem ze 66 žen, z nichž 14 bylo vyřazeno kvůli nepravidelnostem v menstruačním cyklu (kap.4.2). Pro potřeby analýzy zůstalo tedy v souboru 52 žen, 37 z nich se zúčastnilo obou sezení. Věkový průměr všech analyzovaných žen byl 29,02 let, věkový průměr žen užívajících hormonální antikoncepci 27,26 let a neužívajících antikoncepci pak 30,41 let (Tab. 2). Mezi hodnotitelkami bylo 23 žen, které užívaly hormonální antikoncepci a 29 žen, které přirozeně cyklovaly (z nich se 14 zúčastnilo obou sezení).

Ženy (počet)	průměrný věk	věkové rozmezí
celkem (52)	29,02 let	20-47 let
přirozeně cyklující (29)	30,41 let	20-47 let
užívající hormonální antikoncepci (23)	27,26 let	21-40 let

Tab. 2 Věkové rozložení testovaných žen. Tabulka zaznamenává věkový průměr a věkové rozmezí všech žen, které jsme zahrnuli do analýzy (sk.celkem). Tyto ženy pak rozdělují na přirozeně cyklující a ty, které užívaly hormonální antikoncepci.

Sběr vzorků

Sběr vzorků proběhl v termínech 7., 13. a 14. ledna 2010 a 17. a 18. února 2010. K sezení byla využita místnost učebny B2P ve druhém patře Přírodovědecké fakulty v ulici Viničná 7. Abych zabránila nervozitě způsobené příchodem do cizího prostředí, před začátkem samotného testování dostali muži k vyplnění dotazník zaměřený na životní styl a zdravotní stav. Při jeho vyplňování si na prostředí trochu zvykli a posléze jsme uskutečnili nahrávání hlasů a snímání fotografií.

4.1 Vzorky

Testované vzorky, tedy fotografie tváře, hlasové nahrávky a pachové stimuly, pocházely pouze od mužů, u nichž jsme znali informaci o heterozygotnosti jejich HLA alel.

4.1.1 Typizace MHC

Typizace probíhala v laboratoři pro HLA analýzu ve spolupráci s RNDr. Marií Dobrovolnou. Samotnou typizaci pak realizovala kolegyně Bc. Kateřina Vávrová z Přírodovědecké fakulty, z katedry imunologie a buněčné biologie.

Typizovali jsme lokusy HLA -A, -B a -DR. Tyto tři konkrétní lokusy jsme vybrali z toho důvodu, že je využívaly již dřívější studie (např. Wedekind *et al.* 1995 nebo Roberts *et al.* 2005b), a my proto můžeme získané výsledky lépe porovnat. V případě lokusů A a B můžeme navíc očekávat větší ovlivnění individuálního pachu, neboť patří mezi MHC geny I. třídy a jejich produkty jsou exprimovány v buňkách celého těla (Havlíček & Roberts 2009).

Typizace lokusů z krve probíhala podle následujícího postupu:

1) *izolace DNA* - vzorek (350 μ l) odebrané krve s EDTOU (0,5 M EDTA pH 8) jsme přepipetovali do označené izolační zkumavky a spolu s kitem vložili do izolačního přístroje (firmy Geno-M nebo iPrep). Izolovanou DNA (200 μ l) jsme skladovali v mrazícím boxu.

2) *stanovení genotypu* – pracovali jsme metodou sloužící k detekci alel MHC systému na základě určení sekvence nukleotidových bází. Tato metoda je založena na principu přímého sekvenování, kdy se určení sekvence nukleotidů testovaného úseku DNA provádí pomocí cyklického sekvenování.

Provedli jsme tyto kroky:

a) PCR amplifikace (namnožení testovaného úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce s použitím primerů specifických pro testovaný lokus) – do 0,2 ml ependorfky jsme pipetovali

- pro HLA I. třídy: 16 μ l PCR reaction mix; 80 ng DNA, doplnili jsme H₂O do 4 μ l; 0,3 μ l Taq DNA polymerázy
- pro HLA II. třídy: 8 μ l PCR reaction mix; 40 ng DNA, doplnili jsme H₂O do 4 μ l; 0,1 μ l Taq polymerázy

Dále jsme ependorfku vložili do termocycleru a spustili jsme program PCRFA. Provedli jsme kontrolu amplifikace v agarozovém gelu.

b) enzymatické čištění produktů PCR reakce - do každé reakce jsme přidali 3 μ l ExoSap-IT, abychom eliminovaly reziduální primery PCR a dNTP; vložili jsme do cycleru a spustili jsme program EXOSAP

c) sekvenační reakce – do reagenčních zkumavek jsme vložili 8 μ l každé sekvenační směsi, dané pro jednotlivé kity (třídy HLA). Směs obsahovala exon specifické primery, nukleotidy dNTP, fluorescenčně značené nukleotidy dNTP a reakční pufr. Přidali jsme 2 μ l přečištěného PCR produktu a promíchali pipetováním. Vložili jsme zkumavky do termocycleru a spustili jsme program SEQFA. Vzorky jsme uchovávali v mrazícím boxu.

d) čištění produktů sekvenační reakce a separace produktů – ve vodě jsme rozpustili Sephadex pro chromatografii (3g Sephadexu/ 36ml vody), kolonky v Multi Screen desce jsme naplnili roztokem a centrifugovali jsme (60s/2000g/RT). Vzorek jsme

následně napipetovali na střed plochy Sephadexu v kolonce a znovu centrifugovali (60s/2000g/RT). Do každé jamky jsme přidali 15µl formamidu, zakryli krycím septem a vložili do mrazícího boxu. Posléze byla deska zpracovávána v automatickém sekvenátoru ABI 310, ABI 3130.

e) kontrola správnosti přiřazení bází

f) určení konkrétních alel HLA porovnáním sekvence s alelovou databází

Výsledkem celého postupu bylo určení konkrétních alel testovaných lokusů HLA na úrovni čtyřmístné nomenklatury (např. pro alelu A*02010111, mne zajímalo první čtyřčíslicí, kdy první dvojčíslicí udávalo alelickou skupinu a druhé dvojčíslicí už konkrétní alelu). K vyhodnocení jsme využili software Assign, který porovnává testované sekvence s databází IMG/HLA Sequence Database.

Na základě MHC typizace jsme soubor rozdělili na vzorky homozygotní a heterozygotní. Ačkoli jsme typizovali celkem tři lokusy, pro potřebu analýzy jsme považovali vzorek za homozygotní, pokud byl homozygotní alespoň v jednom lokusu. Pokud tedy byly nalezeny shodné alely pro lokus A, hodnocení probíhalo stejně, jako v případě shodných alel na lokusu B nebo DR, stejně tak i v případě shodných alel na dvou či třech lokusech. Z 51 typizovaných vzorků tak bylo 12 homozygotních, kdy 10 vzorků bylo homozygotních v jednom lokusu (čtyři v lokusu HLA -A a šest v lokusu HLA -DR), 2 vzorky ve dvou lokusech (oba v lokusech HLA -B a -DR) a žádný vzorek nebyl homozygotní ve všech třech lokusech a také žádný vzorek nebyl homozygotní v samotném lokusu HLA -B.

4.1.2 Fotografie

4.1.2.1 Snímání fotografií

K pořízení fotografií byl použit fotoaparát Nikon D40X. Fotografie byly pořizovány ze standardní vzdálenosti 1,5 metru od fotografované osoby. Za tou vždy byla ve vzdálenosti dalších 1,5 metru bílá zeď, která sloužila jako nerušivé pozadí. Fotoaparát byl uchycen ve stativu ve výšce, která odpovídala výšce fotografovaného člověka tak, aby fotoaparát mířil přímo proti jeho obličej. K osvětlení tváře jsme použili připojený externí blesk.

Nastavení fotoaparátu bylo vždy stejné a to:

- clona 8
- čas 1/125s.
- ohnisková vzdálenost 50 mm

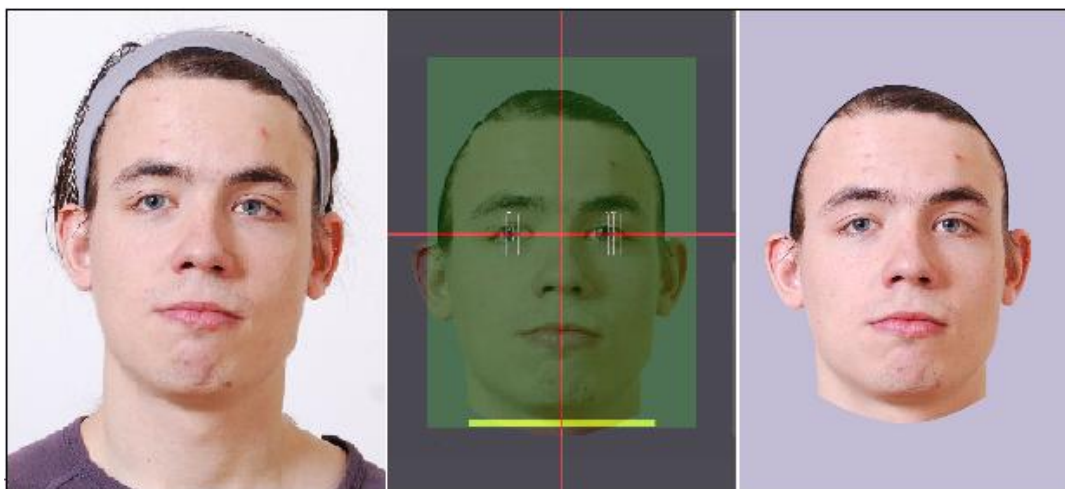
Probandi byli foceni nejprve s vlasy bez jakékoli úpravy a následně s vlasy vyhrnutými z tváře pomocí čelenky. Vždy byli požádáni o neutrální výraz. Každá tvář byla v obou úpravách vyfocena dvakrát.

4.1.2.2 Následná úprava fotografií

Ze dvou získaných fotografií byla následně pro další úpravy vybrána ta, která lépe splňovala potřebné podmínky, tj. neutrální výraz, minimální naklonění hlavy a kvalitu fotografie samotné – např. ostrost apod.

Před samotným testováním jsem fotografie upravila v programu Adobe Photoshop CS3. Tváře jsem vyřízla, odstranila jsem vlasy podle linie čelenky a kolem uší s tím, že při fotografování jsem kladla důraz na to, aby linie čelenky pokud možno kopírovala hranici růstu vlasů. Tváře byly prezentovány bez vlasů, aby se omezil vliv účesu na hodnocení.

Dalším krokem bylo umístění tváře do jednotně velké mřížky tak, aby oči vždy byly umístěny ve stejné výšce. Pokud to symetrie tváře dovoľovala, střední příčka mřížky půlila rty, nos i vzdálenosti mezi očima (Obr. 4).



Obr. 4 Ukázka úpravy fotografie tváře – vlasy probanda byly z čela odstraněny pomocí čelenky, fotografie byla následně umístěna do prostoru pomocí standartní mřížky a očištěna od rušivých elementů (např. vlasy)

Všechny fotografie posléze dostaly uniformní pozadí, a to světle šedé. Cílem těchto úprav bylo minimalizovat rušivé elementy a případné rozdíly mezi fotografiemi. Nakonec byly fotografie nahrány do programu Rater, ve kterém byly hodnoceny.

Podobná procedura úprav i snímání fotografií byla již použita u několika předchozích studií, zabývajících se atraktivitou tváře (např. Roberts *et al.* 2005a, Roberts *et al.* 2005b).

4.1.3 Hlasové nahrávky

4.1.3.1 Nahrání vzorků

K nahrání hlasů jsem vybrala obsahem neutrální text o přibližné délce 250 slov, popisující historický vývoj názoru na vznik a princip duhy. Tento text byl již používán v podobných typech studií (např. Puts *et al.* 2006). Pasáž, kterou jsem později použila při samotném hodnocení, nebyla nijak zvýrazněna.

Probandi nejprve dostali k dispozici celý text, aby se s ním seznámili, a mohli si ho přečíst potichu sami pro sebe. Následně byli požádáni, aby jej přečetli nahlas na mikrofon připojený k diktafonu. Aby se přehnaně nesoustředili na přednes samotný, bylo jim vždy řečeno, aby text přednášeli „familiérně, jako by četli někomu z rodiny“. Mikrofon byl na stole stabilně uchycen ve stojánku ve vzdálenosti 20 cm před probandem. Během nahrávání jsme se snažili udržet v místnosti ticho, abychom zamezili nahrání šumu a zvuků v pozadí. Celá nahrávka trvala přibližně dvě minuty, v závislosti na rychlosti přednesu probanda.

4.1.3.2 Následné úpravy vzorků

Z nahrávky jsem pro následné hodnocení vybrala pouze jednu větu ze začátku druhé poloviny textu (170.-198. slovo). Tato věta byla u všech vzorků stejná. Úmyslně jsem vybrala část uprostřed nahrávky, abych omezila vliv případné nervozity a probandi již byli na čtení na diktafon více zvyklí. V této části textu se už také probandi méně soustředili na přednes a četli více přirozeně. Délka vybrané ukázky byla cca 10 až 15 vteřin v závislosti na rychlosti přednesu probanda.

Abych docílila dobré slyšitelnosti u všech vzorků, zvýšila jsem hlasitost všech nahrávek o 3dB. Tato změna hlasitosti byla zvolena tak, aby tiché nahrávky po této změně byly dostatečně slyšitelné a zároveň, aby hlasitější nahrávky ani případný šum a zvuky v pozadí nahrávky ještě nebyly příliš hlasité a nerušily nahrávku samotnou.

Pro všechny zvukové úpravy (stříhání nahrávky, změny hlasitosti) jsem použila počítačový program Sound Forge Pro 10.0.

4.1.4 Pachové stimuly

4.1.4.1 Sběr vzorků

Na konci sezení, při němž byly snímány audiovizuální stimuly (hlasové nahrávky a fotografie tváře), dostal každý proband balíček na sběr pachových stimulů. Balíček obsahoval:

- tři vatové tampony Ebelin od firmy DM (do každého podpaží jeden plus jeden rezervní),
- hedvábnou náplast Omnisilk od firmy Hartmann o šíři 1 cm na připevnění vatových tamponů,
- bílé bavlněné triko odpovídající velikosti probanda, vyprané v čisté vodě bez pracího prášku,
- plastovou lahvičku o objemu 50 ml s neparfémovaným sprchovým gelem Neutral od firmy Sara Lee,
- dva uzavíratelné sáčky 9 x 13 cm na pachové vzorky
- podrobný návod a harmonogram sběru vzorků, který byl s probandy vždy podrobně probrán při předání balíčku.

Harmonogram sběru byl naplánován vždy do tří dnů v týdnu, který následoval po sezení:

- probandi první den drželi tzv. dárcovskou dietu, tj. nesměli pít alkoholické nápoje, kouřit, jíst aromatická, ostrá a kořeněná jídla (tj. pokrmy obsahující česnek, cibuli, ocet, chilli, pepř, feferonky, plísňové a zrající sýry, ředkvičky, zelí, majonézy, nakládané ryby, kysané mléčné výrobky). Nepoužívali antiperspiranty, deodoranty ani jiné parfémy nebo parfémované toaletní potřeby. Večer již použili pouze neparfémované mýdlo Neutral.
- druhý den dietní omezení trvala, navíc přibyla omezení týkající se náročných fyzických aktivit, sexuálních aktivit, spaní v jedné posteli s partnerem či domácím mazlíčkem. Večer, kolem 19. hodiny, se probandi osprchovali (opět s použitím neparfémovaného mýdla) a do obou podpaží si náplastí upevnili vatové tampony

hrubší stranou k tělu. Jako první vrstvu oděvu pak měli následujících 12 hodin bílé bavlněné tričko.

- třetí den kolem sedmé hodiny ranní (po 12 hodinách) odlepili vatové tampony, vložili je do uzavíratelných mikrotenových sáčků a vzorky donesli buď na Přírodovědeckou fakultu nebo na Fakultu humanitních studií. Tam byly vzorky popsány identifikačním kódem a okamžitě zamraženy.

Většina mužů donesla vzorky hned dopoledne, takže ke zmražení došlo brzy. Ve třech případech došlo k předání v pozdějších hodinách. V takovém případě byli probandi instruováni, aby vzorky skladovali v chladu, většinou v ledničce. Při předání vzorků také vyplnili poodběrový dotazník, ve kterém jsme se zaměřili na dodržení restrikcí před odběrem. Seznam restrikcí i metodika sběru byla použita podobně, jako v přechozích studiích s podobnou metodikou (např. Thornhill *et al.* 2003, Havlíček & Lenochová 2006).

4.1.4.2 Následná příprava vzorků

Vzorky byly zamraženy až do testování, které probíhalo od konce května 2010. Toto zmražení by nemělo mít na pach vzorků vliv (Lenochová *et al.* 2009, Roberts *et al.* 2008). Před hodnocením byly vzorky ponechány v pokojové teplotě vždy přibližně hodinu, aby došlo k jejich rozmražení. Následně byly rozpůleny a vloženy do prachovnic z hnědého neprůhledného skla a se zábrusovou zátkou (o objemu 500ml), které byly označeny kódem pro identifikaci. Do každé prachovnice byla umístěna jedna polovina vzorku, hrubší stranou navrch, aby se pach mohl dobře uvolnit. Poté byla prachovnice uzavřena zábrusovou zátkou. Veškerá manipulace se vzorky probíhala pomocí pinzet, abychom zabránili případné kontaminaci vzorků jiným pachem.

4.2 Testování

Testování probíhalo ve dvou fázích, a to proto, aby ženy, které neužívají hormonální antikoncepci, dorazily jednou ve folikulární a jednou v luteální fázi cyklu. Ženy, které hormonální antikoncepci užívají, také dorazily dvakrát. První sezení proběhlo ve dnech 24. - 27. 5., druhé pak 7. - 10. 6. 2010. Vzorky hodnotily pouze ženy, celkem jich na hodnocení dorazilo 52.

Před začátkem sezení jsem ženy kontaktovala, abych zjistila údaje týkající se jejich menstruačního cyklu, které jsem potřebovala k určení ideálního termínu na hodnocení. Vždy jsem se snažila pozvat je jednou mezi 8. až 14. dnem cyklu, kdy probíhá folikulární fáze, podruhé pak mezi 17. až 25. dnem cyklu, kdy je fáze luteální. Bohužel jsem i tak musela čtrnáct žen z hodnocení vyřadit, protože kvůli nepravidelnosti svého cyklu menstruovaly v termínu sezení (jednalo se o 13 žen). Jedna probandka také zpětně zjistila, že během testování byla v prvním trimestru těhotenství. Takto se snížil především počet cyklujících hodnotitelek, u kterých ke změnám během cyklu dochází. O přesnosti určení fáze cyklu jsem se následně ujistila pomocí ovulačního testu RapiClear, který probandky dostaly po testování domů a jehož výsledky mi následně sdělily mailem. Fázi cyklu jsem tedy určila z termínu poslední menstruace před testováním a termínu ovulace. Během prvního sezení bylo z 23 žen, které užívají hormonální antikoncepci, 16 v období odpovídající luteální fázi a 7 ve folikulární fázi. Z 29 cyklujících žen bylo na prvním sezení 12 žen v luteální fázi a 9 ve folikulární fázi, na druhém sezení pak bylo 13 žen v luteální fázi a 9 žen ve folikulární fázi. Z těchto žen se pouze 14 zúčastnilo obou sezení, na prvním sezení bylo 9 z nich v luteální fázi a 5 ve folikulární fázi, na druhém sezení to pak bylo naopak.

4.2.1 Podmínky testování

Testování probíhalo na Přírodovědecké fakultě. Během testování jsem se snažila udržet stabilní teplotu a vlhkost v místnosti pomocí klimatizace. Vzhledem k vysokým venkovním teplotám během druhého sezení bohužel klimatizace nestačila udržet nízkou teplotu v místnosti a průměrná teplota tu byla poněkud vyšší. Teplota během prvního testování dosahovala průměrně 23,34°C, relativní vlhkost vzduchu byla 46,79%, zatímco během druhého sezení byla průměrná teplota 26,37°C a relativní vlhkost vzduchu 48,85% (Tab. 3).

1. testování		
termín	průměrná teplota	průměrná relativní vlhkost vzduchu
24.5.	22,88°C	51,08%
25.5.	23,54°C	49,71%
26.5.	23,62°C	41,00%
27.5.	23,32°C	45,40%
průměr během sezení	23,34°C	46,79%
2. testování		
termín	průměrná teplota	průměrná relativní vlhkost vzduchu
7. 6.	25,00°C	49,10%
8.6.	26,46°C	41,00%
9.6.	26,68°C	52,00%
10.6.	27,40°C	53,28%
průměr během sezení	26,38°C	48,85%

Tab. 3 Teplota a vlhkost v testovací místnosti během prvního (horní tab.) a druhého (dolní tab.) testování.

Probandky byly zvány na hodnocení vždy ve stejnou hodinu z toho důvodu, aby žena, která hodnotila během prvního sezení například v deset hodin dopoledne, prováděla hodnocení během druhého sezení v co nejpodobnějším čase. Realizace tohoto požadavku se nám dařila, většina dvojic hodnocení proběhla ve stejnou denní dobu. Toto bylo důležité kvůli možným cirkadiálním fluktuacím v čichových schopnostech, a také proto, že se během dne mění stáří vzorků.

K hodnocení vzorků byly ženy zvány průměrně po 15 až 20 minutách, aby hodnocení probíhalo v klidných podmínkách. Tomu napomáhalo i rozdělení vzorků do skupin (viz. níže).

4.2.2 Uspořádání vzorků

4.2.2.1 Pachové stimuly

Při čichovém hodnocení dochází poměrně rychle k habituaci. Počet hodnocených vzorků je proto v obdobných studiích omezen na max. 20 vzorků (např. Havlíček *et al.* 2005). Z tohoto důvodu bylo 49 pachových stimulů rozděleno do dvou skupin (Tab. 4).

Sk. A	26 vzorků	1. polovina 13 vz.
		2. polovina 13 vz.
Sk. B	23 vzorků	1. polovina 12 vz.
		2. polovina 11 vz.

Tab. 4 Rozdělení pachových stimulů do skupin A a B, následné rozdělení skupin na půl, do skupinek po 11 až 13 vzorcích.

Každá žena pak hodnotila pouze jednu skupinu, A nebo B. Po polovině zhodnocených vzorků byla vždy vložena pauza na regeneraci, během které ženy hodnotily fotografie. Pachové vzorky byly rozřazovány do skupin s ohledem na homozygotnost, a to tak, aby v každé skupině bylo pokud možno stejné zastoupení homozygotů (tj. šest na každou skupinu). Jinak bylo toto rozdělení náhodné a pro mne anonymní, během hodnocení jsem tedy nevěděla, které vzorky patří homozygotům a které heterozygotům.

Abychom měli na každé sezení k dispozici všechny potřebné vzorky, rozhodli jsme se každý tampon rozpůlit. Tím jsme získali čtyři vzorky od každého probanda (2 z pravého a 2 z levého podpaží). Každá polovina vatového tamponu byla hodnocena po dobu dvou dnů, přes noc byla umístěna v mrazícím boxu. Během prvního sezení jsme použili od každého probanda jednu polovinu vzorku z levého podpaží (na první dva dny) a jednu polovinu z pravého (na druhé dva dny). Tím jsme pokryli všech osm dní testování, aby i během druhého sezení měla každá žena k dispozici vždy čerstvé stimuly od týž probandů. Navíc jsme mohli využít obě skupiny vzorků zároveň (A i B), což umožnilo větší časovou flexibilitu hodnocení. Díky tomu jsme mohli v případě potřeby nechat vzorky hodnotit dvě ženy najednou, aniž by se přitom vzájemně rušily.

4.2.2.2 Hlasové nahrávky

Hlasové nahrávky byly rozděleny do skupin podle stejného principu jako pachové stimuly. Bylo taktéž dodrženo stejné rozvržení vzorků mezi skupinu A a B (tj. vzorek pachu i hlasu od každého probanda byl ve stejné skupině). Skupina A měla 26 vzorků, skupina B pak 25 vzorků, každou skupinu jsme ještě rozdělili napůl, aby při hodnocení nedocházelo k přílišné únavě hodnotitelek. Ženy nejprve hodnotily jednu polovinu, po pauze pak druhou polovinu vzorků. Každá žena opět hodnotila pouze jednu skupinu nahrávek, A nebo B, a to stejnou, jako při hodnocení pachových stimulů.

Nahrávky byly prezentovány na notebookách pomocí programu Rater, který určoval náhodné pořadí vzorků. Pro poslech byla u všech notebooků použita stejná sluchátka do uší značky TEAC.

4.2.2.3 Fotografie

Atraktivita tváří byla hodnocena u všech jednapadesáti vzorků, zde nebylo nutné vytvářet skupiny pro účely hodnocení, neboť k únavě při hodnocení dochází později. Každá žena ohodnotila všechny vzorky a to pomocí programu Rater na displejích notebooků. Rater prezentoval fotografie v náhodném pořadí. Všechny notebooky měly displej nastaven vždy na stejné rozlišení (1024 x 768 pix.).

4.2.3 Hodnocení

Celé hodnocení trvalo u každé hodnotitelky zhruba hodinu. Kromě hodnocení jednotlivých stimulů a dotazníku ohledně menstruačního cyklu, byly ženám dány na vyplnění dotazníky týkající se životního stylu, sexuálních aktivit, altruismu a spokojenosti ve vztahu. Tyto dotazníky nejsou součástí této diplomové práce.

Harmonogram hodnocení byl následující:

- probandka dorazila ve smluvený čas
- byla jí puštěna první polovina krátkého romantického videa (cca 4minuty)
- ohodnotila první polovinu pachových stimulů (z jedné přidělené skupiny - A nebo B)
- ohodnotila první polovinu hlasových nahrávek (z téže skupiny)
- zhlédla a ohodnotila všechny fotografie tváří
- byla jí puštěna druhá polovina videa (opět o délce cca 4minuty)
- ohodnotila druhou polovinu pachových stimulů (z téže skupiny)
- ohodnotila druhou polovinu hlasových nahrávek (z téže skupiny)
- vyplnila dotazník ohledně menstruačního cyklu

Během hodnocení jsme se snažili výše uvedený harmonogram pokud možno dodržet, ovšem toto pořadí se nepodařilo zachovat 5x v prvním a 5x v druhém sezení u žen, které se

dostavily na obě sezení. U žen s pouze jedním sezením jsme pořadí nedodrželi 2x. K ústupkům docházelo tehdy, když přišlo příliš mnoho žen najednou, takže se na všechny nedostaly notebooky se sluchátky. Proto pak některé ženy hodnotily fotografie mimo pořadí. Vždy však bylo zachováno pořadí video-hodnocení pachu-hodnocení hlasů.

Romantické video jsme zvolili s ohledem na to, že dřívější studie poukazují na vliv sociálního kontextu na čichové vnímání (Bensafi *et al.* 2004). Zároveň bylo promítnutí videa vhodné pro zklidnění a aklimatizaci žen v neznámém prostředí. Jako romantická ukázka pro první sezení byla vybrána část filmu *Zakázané ovoce* (režie: S. Soderbergh, 1998), pro druhé pak část filmu *Láska nebeská* (režie: R. Curtis, 2003). Obě ukázky byly vhodně rozpůleny, aby mohly být puštěny před oběma hodnoceními pachových vzorků. Pro výběr videa byla provedena pilotní studie a vybrána byla ta videa, u nichž byla největší shoda v navození romantické až vzrušující atmosféry.

Jediná výrazně pohyblivá položka harmonogramu byl dotazník ohledně menstruačního cyklu, který byl v případě potřeby dán k vyplnění hned na začátku testování. Bylo to vhodné zvláště pro případy, kdy hodnotitelka dorazila dříve nebo některá hodnotila déle. Navíc mi tento dotazník umožnil odhalit případné nejasnosti v menstruačním cyklu a tudíž se znovu ujistit o jeho fázi. Ostatní dotazníky, například ohledně životního stylu nebo sexuální aktivity, byly ženám dány na vyplnění domů.

Hodnocení všech stimulů probíhalo na sedmibodové škále od 1 (neatraktivní) do 7 (atraktivní). Prostřední hodnota 4 byla označena jako neutrální. Vzhledem k tomu, že různé otázky mají různý podtext, byla ženám položena vždy stejná otázka a to: „Jak Vám tato tvář/tento hlas/pach připadá atraktivní?“.

Design hodnocení byl identický během obou sezení, snažili jsme se zachovat i pokud možno stejný přístup k hodnotitelkám (např. při vysvětlování sedmibodové škály).

4.3 Analýza dat

K analyzování získaných dat byl využit statistický program SPSS 16.0, data jsme vyhodnotili pomocí GLM (tj. obecné lineární modely, angl. general linear model) ANOVy, kde jsme pro specifikaci efektu mezi subjekty použili dvoucestnou ANOVu s opakovanými měřeními, neboť jsme museli zohlednit, že data vznikla opakovaným hodnocením téhož subjektu. Jednotkou analýzy zde byla hodnotitelka, kdy od každé hodnotitelky vstupovalo do analýzy

průměrné hodnocení všech homozygotů a všech heterozygotů. Jednalo se o souhrnný model pro efekt fáze cyklu, heterozygotnosti a skupiny žen na hodnocení atraktivity třech modalit – hlasu, tváře a pachu.

Jako vnitrosubjektový (angl. within-subjects) faktor nás zajímala jednak fáze menstruačního cyklu (tj. zda se hodnotící žena nacházela ve folikulární či luteální fázi) a jednak heterozygotnost (tj. zda byl hodnocený vzorek homozygotní či heterozygotní). Jako mezisubjektový (angl. between-subjects) faktor byla zadána skupina hodnotících žen (tj. jedna skupina žen, které užívají hormonální antikoncepci, kde bylo $N=23$, a druhá skupina žen s přirozeným cyklem, kde bylo $N=14$). V případě signifikantních výsledků v rámci celkového modelu byly provedeny příslušné post-hoc testy, což byl buď párový t-test nebo t-test s nezávislými výběry.

Dále, mimo souhrnný model, byl testován vliv pořadí sezení na hodnocení atraktivity, neboť jsme chtěli zjistit, zda má na hodnocení vliv opakování, zapamatování vzorků a habituace na prostředí i testování samotné. V tomto případě byla data testována pomocí GLM ANOVy s opakovanými měřeními, kdy within-subjects faktor bylo sezení a závislá proměnná byla atraktivita pachu, tváře a hlasu. Pro tuto analýzu byla data uspořádána podle proběhlých sezení, nikoli podle fází cyklu.

Celkový model použitý pro analýzu:

Dvoucestná ANOVA s opakovanými měřeními

WS factors: fáze cyklu, heterozygotnost

BS factors: skupina žen

Závislá proměnná: atraktivita pachu, atraktivita tváře, atraktivita hlasu

Do celkového modelu byly zahrnuty hlavní efekty všech faktorů i jejich interakce (tj. fáze cyklu*skupina, heterozygotnost*skupina, fáze cyklu*heterozygotnost, fáze cyklu*heterozygotnost*skupina).

Post-hoc testem byl párový t-test a t-test s nezávislými výběry

Následné post-hoc testy byly provedeny v případě, že se v celkovém modelu ukázal vliv interakce faktorů na závislou proměnnou signifikantní nebo blízky hranici signifikance.

Konkrétní podoba post-hoc testu je uvedena dále. Podmínky normality nutné pro možné použití t-testů byly splněny.

Model analýzy pro rozdíl v hodnocení mezi prvním a druhým sezením:

ANOVA s opakovanými měřeními

WS factors: sezení

Závislá proměnná: atraktivita pachu, atraktivita tváře, atraktivita hlasu

5. Výsledky

5.1 Celková atraktivita

Z celkového modelu analýzy byl, bez ohledu na konkrétní fyzické znaky, zjištěn signifikantní vliv heterozygotnosti na hodnocení ($\lambda^2=0,711$; $F(3,33)=4,467$; $p=0,010$) a dále signifikantní vliv na hodnocení u interakce heterozygotnosti s fází menstruačního cyklu ($\lambda^2=0,777$; $F(3,33)=3,156$; $p=0,038$) (Tab. 5).

Celkový vliv faktorů:	λ^2	F (3,33)	p	part.Eta sq.
Fáze cyklu	0,894	1,300	0,291	0,106
Fáze cyklu*skupina	0,847	1,984	0,135	0,153
Heterozygotnost	0,711	4,467	0,010	0,289
Heterozygotnost*skupina	0,950	0,584	0,630	0,050
Fáze cyklu*heterozygotnost	0,777	3,156	0,038	0,223
Fáze cyklu*heterozygotnost*skupina	0,934	0,722	0,518	0,066
Skupina	0,949	0,587	0,628	0,051

Tab. 5 Výsledky celkového GLM modelu týkající se vlivu faktorů a jejich interakcí na hodnocení atraktivity bez ohledu na konkrétní závislou proměnnou. V tabulce jsou uvedeny hodnoty statistiky F a hodnoty p odpovídající 3,33 stupňům volnosti. Signifikantní výsledky jsou vyznačeny žlutě. Dále jsou v tabulce uvedeny hodnoty pro rozdělení pravděpodobností - Wilks'lambda (λ^2) a je uvedeno, jakou část variability vysvětluje konkrétní faktor (part. Eta sq.).

Na souhrnné hodnocení atraktivity v rámci všech modalit má tedy vliv faktor heterozygotnosti a interakce heterozygotnost*fáze cyklu, ostatní faktory a interakce faktorů nemají na souhrnné hodnocení atraktivity signifikantní vliv. Konkrétní směr vlivu faktoru heterozygotnosti (Tab. 6) a interakce faktorů fáze cyklu*heterozygotnost (Tab. 7) popisují předpokládané průměry, angl. estimated marginal means. Homozygotní jedinci tedy byli hodnoceni signifikantně jako atraktivnější a tyto preference byly signifikantně výraznější během folikulární fáze cyklu.

Estimated Marginal Means (EMM)	heterozygotnost	atraktivita
Heterozygotnost a atraktivita:	homozygot	3,239
	heterozygot	3,125

Tab. 6 Estimated marginal means pro vliv faktoru heterozygotnosti na hodnocení atraktivity (bez ohledu na konkrétní stimul)

Estimated Marginal Means (EMM)	fáze cyklu	heterozygotnost	atraktivita
Fáze cyklu*heterozygotnost a atraktivita:	folikulární	homozygot	3,341
		heterozygot	3,150
	luteální	homozygot	3,137
		heterozygot	3,100

Tab. 7 Estimated marginal means pro vliv interakce fáze cyklu s heterozygotností na hodnocení atraktivity (bez ohledu na konkrétní stimul)

Dále se analýza zaměřila na vliv within-subject faktorů a jejich interakcí na jednotlivé nezávislé proměnné, tj. na hodnocení pachových stimulů, fotografií tváře a hlasových nahrávek.

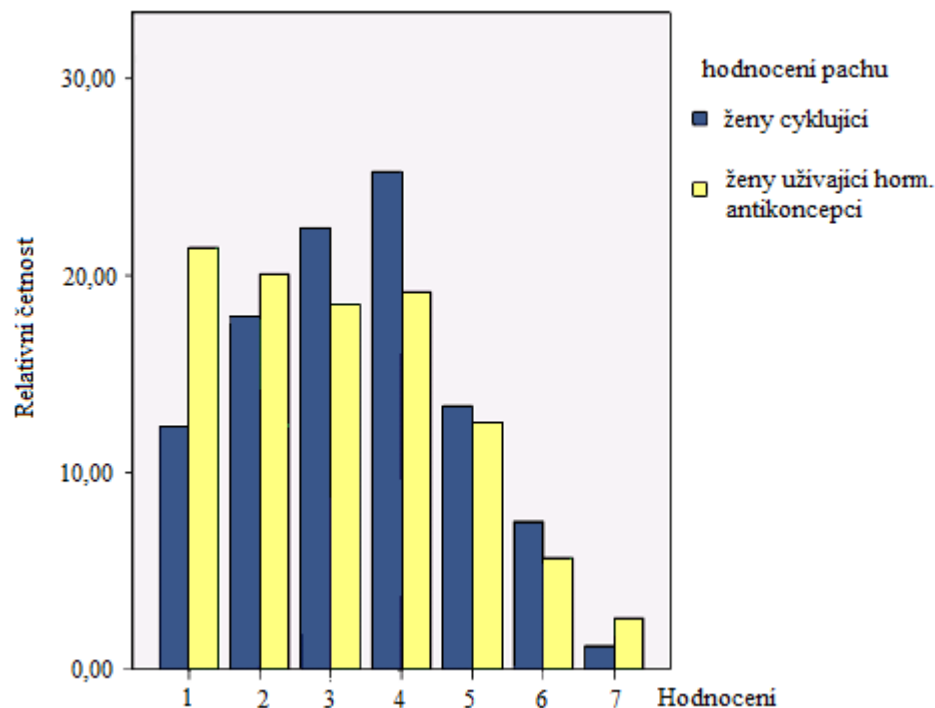
5.2 Atraktivita pachu

Výsledky celkového modelu nám ukazují, že na hodnocení atraktivity pachu nemá žádný ze sledovaných faktorů ani jejich interakce signifikantní vliv (Tab. 8).

Vliv faktorů na atraktivitu pachu:	F (1,33)	p	part.Eta sq.
Fáze cyklu	0,988	0,327	0,027
Fáze cyklu*skupina	0,512	0,479	0,014
Heterozygotnost	1,539	0,223	0,042
Heterozygotnost*skupina	1,682	0,203	0,046
Fáze cyklu*heterozygotnost	0,104	0,749	0,003
Fáze cyklu*heterozygotnost*skupina	0,512	0,479	0,014
Skupina	1,413	0,243	0,039

Tab. 8 Výsledky celkového modelu, které ukazují vliv sledovaných faktorů a jejich interakcí na hodnocení atraktivity pachu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty statistiky F a hodnoty p odpovídající 1,33 stupňům volnosti a je uvedeno, jakou část variability vysvětluje konkrétní faktor (part. Eta sq.).

Vliv between-subject faktoru skupiny, v rámci kterého byly ženy rozděleny na přirozeně cyklující a ty, které užívají hormonální antikoncepci, se na hodnocení atraktivity pachu také nijak signifikantně neprojevil. Rozdíl v celkovém hodnocení žen s hormonální antikoncepcí a bez ní tedy nebyl u hodnocení pachu zjištěn, avšak je zajímavé, že pokud se podíváme na zadávaná hodnocení, můžeme zaznamenat, že cyklující ženy mají tendenci používat vyšší škálu hodnocení (Graf 1).



Graf 1 Procentuální zastoupení zadávaných hodnocení při testování atraktivitu pachových stimulů.

5.3 Atraktivita tváře

Hodnocení atraktivitu tváře je ovlivněno signifikantně interakcí fáze cyklu s heterozygotností ($F(1,33)=4,550$; $p=0,04$). Jiné faktory pak na hodnocení atraktivitu tváře signifikantní vliv nemají (Tab. 9).

Vliv faktorů na atraktivitu tváře:	F (1,33)	p	part.Eta sq.
Fáze cyklu	2,618	0,115	0,070
Fáze cyklu*skupina	0,076	0,784	0,002
Heterozygotnost	0,093	0,762	0,003
Heterozygotnost*skupina	0,291	0,593	0,008
Fáze cyklu*heterozygotnost	4,550	0,040	0,115
Fáze cyklu*heterozygotnost*skupina	1,284	0,265	0,035
Skupina	1,028	0,318	0,029

Tab. 9 Výsledky celkového modelu zaměřené na vliv sledovaných faktorů na hodnocení atraktivitu tváře. Uvádím part. Eta square, hodnoty statistiky F a hodnoty p při 1,33 stupních volnosti. Signifikantní výsledky jsou v tabulce vyznačeny žlutě.

- **Vliv interakce fáze cyklu*heterozygotnost vzorku na hodnocení atraktivity tváře:**

Konkrétní směr vlivu této interakce ilustrují hodnoty estimated marginal means (Tab. 10), kdy ženy ve folikulární fázi hodnotí homozygoty i heterozygoty lépe než ve fázi luteální, avšak u homozygotů je tento rozdíl výraznější. U heterozygotů je trend podobný, ale méně výrazný. Abychom zjistili, které změny jsou signifikantní, provedli jsme post-hoc testy.

Estimated Marginal Means (EMM)	fáze cyklu	heterozygotnost	atraktivita tváře
Fáze cyklu*heterozygotnost a atraktivita tváře:	folikulární	homozygot	2,800
		heterozygot	2,759
	luteální	homozygot	2,599
		heterozygot	2,693

Tab. 10 Estimated marginal means pro vliv interakce fáze cyklu s heterozygotností na hodnocení atraktivity tváře.

Post-hoc testy:

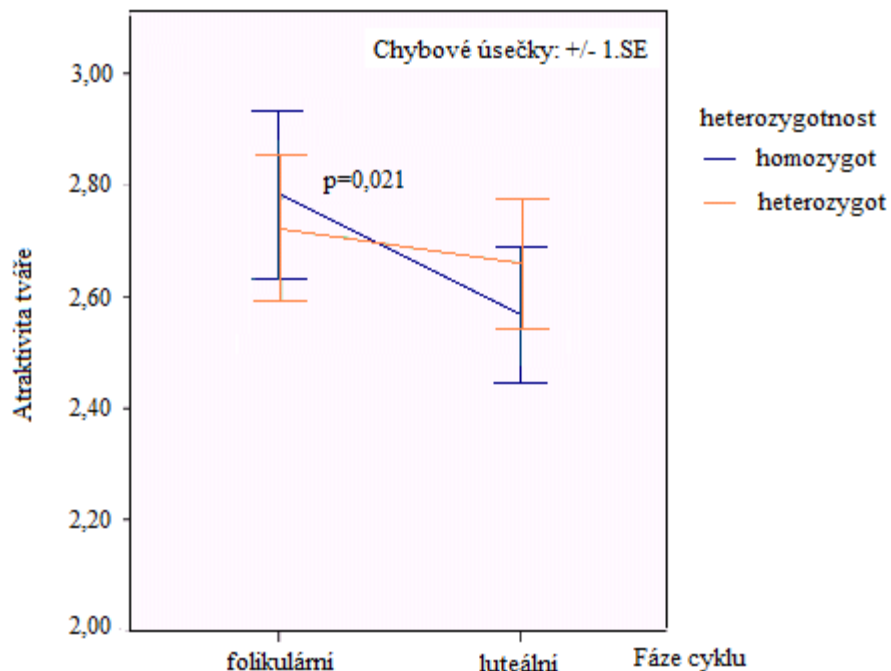
Tváře homozygotů byly hodnoceny signifikantně atraktivnější ve folikulární fázi cyklu než v luteální fázi cyklu ($t(36)=2,405$; $p=0,021$).

Hodnocení tváří heterozygotů se signifikantně nelišilo ve folikulární a v luteální fázi cyklu ($t(36)=0,782$; $p=0,440$).

Ve folikulární fázi nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi hodnocením atraktivity tváře heterozygotů a homozygotů ($t(44)=1,048$; $p=0,300$).

V luteální fázi cyklu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnocení tváří homozygotů a heterozygotů ($t(43)= -1,169$; $p=0,249$).

Ženy ve folikulární fázi hodnotí tváře homozygotů jako atraktivnější než ženy v luteální fázi cyklu (ovšem ne jako signifikantně atraktivnější než tváře heterozygotů), u atraktivity heterozygotů se změna během cyklu signifikantně neprojevuje (Graf 2).



Graf 2 Vliv interakce fáze cyklu s heterozygotností. Ve folikulární fázi cyklu ženy preferují tváře homozygotů (modrá linie) signifikantně více než v luteální fázi cyklu ($p=0,021$). Rozdíl preferencí ale není signifikantní proti tvářím heterozygotů (oranžová linie). Chybové úsečky znázorňují +/- 1 střední chybu průměru.

5.4 Atraktivita hlasu

U hlasových nahrávek se projevilo nejvíce faktorů. Na atraktivitu hlasu měla signifikantní vliv heterozygotnost ($F(1,33)=7,812$; $p=0,008$) a také interakce fáze cyklu a heterozygotnosti ($F(1,33)=6,183$; $p=0,018$). Hladině signifikance se blížil vliv fáze cyklu ($F(1,33)=3,458$; $p=0,071$) a interakce fáze cyklu se skupinou ($F(1,33)=3,895$; $p=0,056$) (Tab. 11). Vliv faktoru skupiny se na hodnocení atraktivity hlasu nijak signifikantně neprojevilo. Užívání nebo neužívání hormonální antikoncepce tedy výsledek nijak signifikantně nezměnilo.

Vliv faktorů na atraktivitu hlasu:	F (1,33)	p	part.Eta sq.
Fáze cyklu	3,458	0,071	0,090
Fáze cyklu*skupina	3,895	0,056	0,100
Heterozygotnost	7,812	0,008	0,182
Heterozygotnost*skupina	0,019	0,89	0,001
Fáze cyklu*heterozygotnost	6,183	0,018	0,150
Fáze cyklu*heterozygotnost*skupina	0,089	0,768	0,003
Skupina	0,811	0,374	0,023

Tab. 11 Výsledky celkového modelu pro vliv faktorů a jejich interakcí na atraktivitu hlasu. V tabulce uvádím hodnoty statistiky F a hodnoty p odpovídající 1,33 stupňům volnosti, dále hodnoty part. Eta square. Signifikantní výsledky jsou v tabulce vyznačeny žlutě a výsledky blížící se hladině signifikance jsou vyznačeny oranžově.

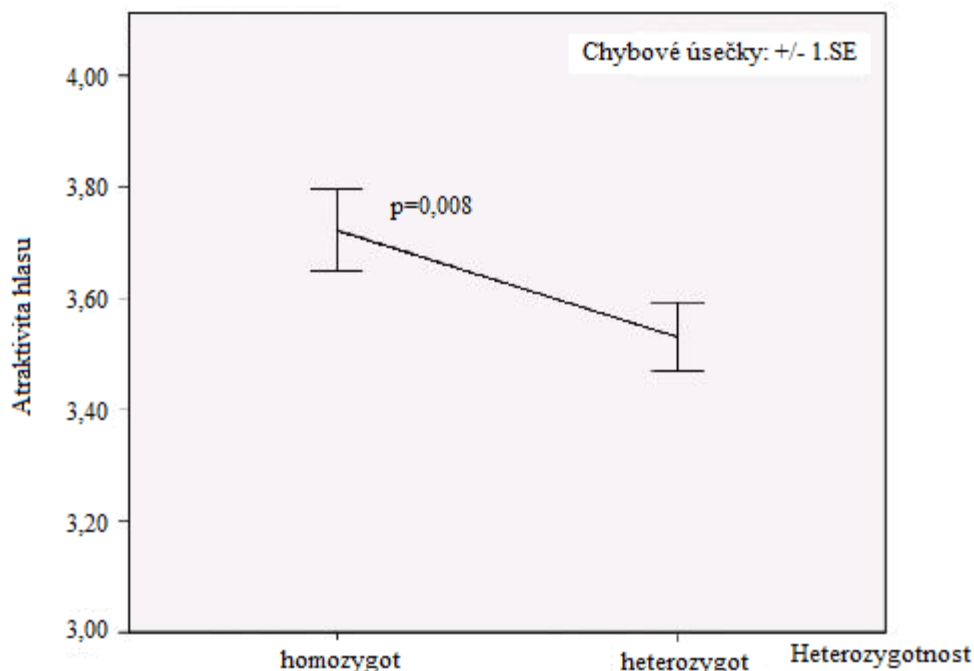
- **Vliv faktoru heterozygotnosti na hodnocení atraktivity hlasu**

Pokud se podíváme na hodnoty estimated marginal means (Tab. 12) vidíme, že hodnocení atraktivity hlasu homozygotů dosahuje vyšší hladiny než hodnocení atraktivity hlasu heterozygotů. Tento rozdíl v hodnocení hlasu homozygotů a heterozygotů je signifikantní ($p=0,008$).

Estimated Marginal Means (EMM)	heterozygotnost	atraktivita hlasu
Heterozygotnost a atraktivita hlasu:	homozygot	3,701
	heterozygot	3,465

Tab. 12 Hodnoty estimated marginal means pro hodnocení atraktivity hlasu s ohledem na heterozygotnost ukazují vyšší hodnocení homozygotů.

Sledovaný rozdíl v hodnocení hlasu homozygotů a heterozygotů můžeme vidět i na následujícím grafu (Graf 3).



Graf 3 Rozdíly v hodnocení atraktivity hlasu homozygotních a heterozygotních jedinců. Chybové úsečky znázotňují +/- 1 střední chybu průměru.

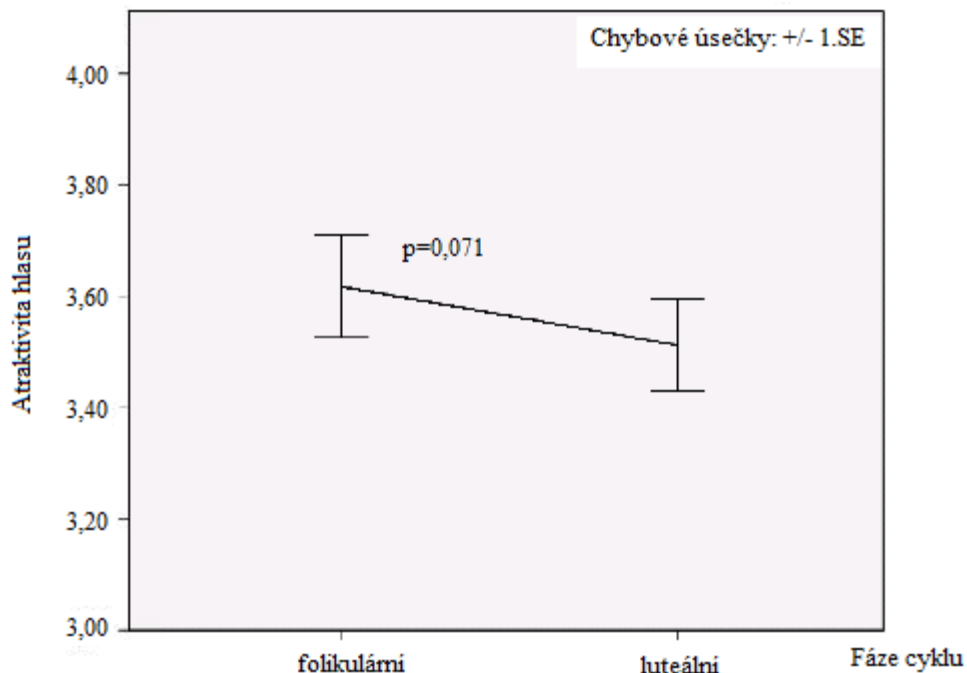
- **Vliv fáze cyklu na hodnocení atraktivity hlasu**

Fáze menstruačního cyklu má na hodnocení atraktivity hlasu vliv blízcí se hladině signifikance ($p=0,071$). Estimated marginal means ukazují vyšší hodnocení atraktivity hlasu během folikulární fáze cyklu (Tab. 13).

Estimated Marginal Means (EMM)	fáze cyklu	atraktivita hlasu
Fáze cyklu a atraktivita hlasu:	folikulární	3,655
	luteální	3,511

Tab. 13 Hodnocení atraktivity hlasu (bez ohledu na heterozygotnost) popisují hodnoty estimated marginal means. Tato změna hodnocení atraktivity hlasu ve folikulární a v luteální fázi cyklu není signifikantní.

Změnu hodnocení atraktivity hlasu mezi folikulární a luteální fází cyklu ilustruje i následující graf (Graf 4).



Graf 4 Rozdíl v hodnocení atraktivity hlasu ze strany žen ve folikulární a v luteální fázi cyklu se blíží hladině signifikance ($p=0,071$). Chybové úsečky znázorňují ± 1 střední chybu průměru.

Ženy, které se nacházejí ve folikulární fázi, hodnotí obecně hlasy mužů jako atraktivnější než ženy ve fázi luteální a tento rozdíl se blíží hladině signifikance.

- **Vliv interakce fáze cyklu*skupina (ženy, které užívají hormonální antikoncepci a ženy, které přirozeně cyklují) na atraktivitu hlasu:**

Hodnoty estimated marginal means (Tab. 14) pro cyklující ženy ukazují rozdíl v hodnocení ve folikulární a v luteální fázi cyklu. U žen, které užívají hormonální antikoncepci k takto výrazné změně nedochází. Pro zjištění průkazných změn v konkrétním případě byly provedeny post-hoc testy.

Estimated Marginal Means (EMM)	skupina	fáze cyklu	atraktivita hlasu
Fáze cyklu*skupina a atraktivita hlasu:	cyklující	folikulární	3,803
		luteální	3,508
	užívající horm. antikoncepci	folikulární	3,506
		luteální	3,515

Tab. 14 Estimated marginal means pro vliv interakce faktorů fáze cyklu a skupina na hodnocení atraktivity hlasu.

Post-hoc testy:

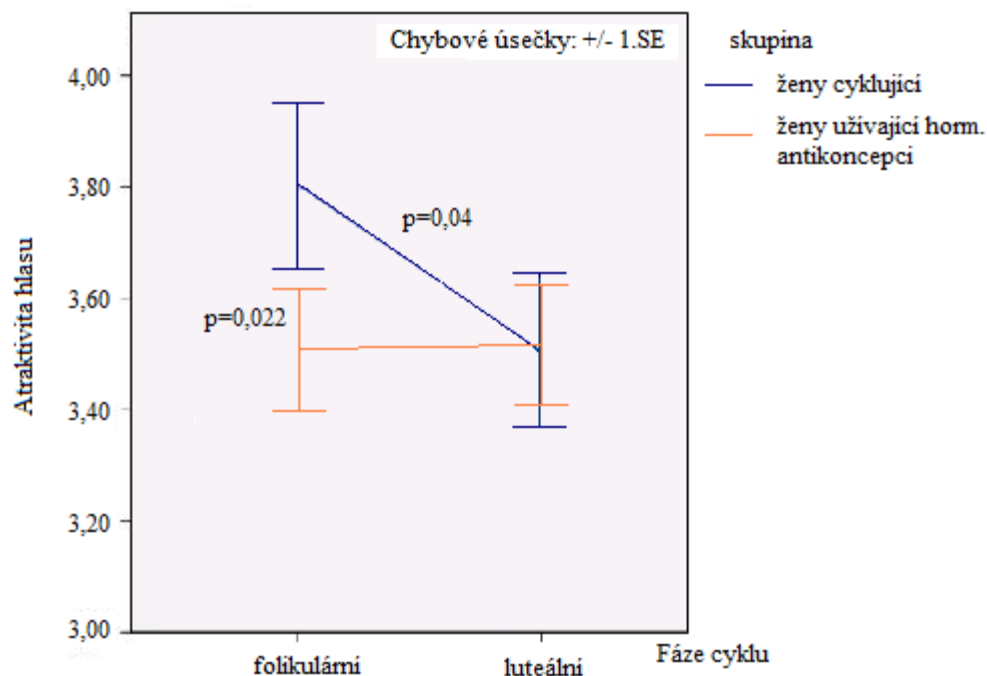
U přirozeně cyklujících žen bylo zjištěno signifikantně vyšší hodnocení atraktivity hlasu ve folikulární fázi než v luteální fázi cyklu ($t(13)=2,267$; $p=0,04$).

U žen, které užívají hormonální antikoncepci bylo hodnocení hlasu ve folikulární a v luteální fázi cyklu bez signifikantních změn ($t(22)=0,097$; $p=0,924$).

Ve folikulární fázi cyklu hodnotí přirozeně cyklující ženy hlasy signifikantně jako atraktivnější než ženy užívající hormonální antikoncepci ($t(43)= 2,382$; $p=0,022$).

V luteální fázi cyklu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnocení žen přirozeně cyklujících a žen, které užívají hormonální antikoncepci ($t(42)= 0,443$; $p=0,660$).

Ženy, které neužívají hormonální antikoncepci, ve folikulární fázi hodnotí hlas jako atraktivnější. U žen užívajících hormonální antikoncepci se hodnocení mezi jednotlivými fázemi cyklu neliší. Během folikulární fáze se signifikantně liší hodnocení žen cyklujících a žen, které užívají hormonální antikoncepci, kdy ženy užívající hormonální antikoncepci hodnotí hlasy jako méně atraktivní (Graf 5). V luteální fázi se pak hodnocení žen, které užívají hormonální antikoncepci a žen, které přirozeně cyklují, téměř neliší.



Graf 5 Vliv interakce fáze cyklu a skupiny na hodnocení atraktivity hlasu (bez ohledu na heterozygotnost stimulu). Ženy cyklující hodnotí ve folikulární fázi hlas jako atraktivnější než ve fázi luteální ($p=0,04$). Dále se ve folikulární fázi významně liší hodnocení žen, které užívají hormonální antikoncepci a žen, které přirozeně cyklují ($p=0,022$). Chybové úsečky znázorňují ± 1 střední chybu průměru.

- **Vliv interakce fáze cyklu*heterozygotnost vzorku na hodnocení atraktivity hlasu:**

Vliv interakce fáze cyklu a heterozygotností na hodnocení atraktivity hlasu ilustrují estimated marginal means. V tomto případě je ve folikulární fázi cyklu vyšší hodnocení homozygotů oproti heterozygotům. V luteální fázi cyklu je rozdíl v hodnocení homozygotů a heterozygotů podstatně menší, tyto hodnoty jsou ale v obou případech nižší než hodnoty z hodnocení během folikulární fáze cyklu (Tab. 15).

Estimated Marginal Means (EMM)	fáze cyklu	heterozygotnost	atraktivita hlasu
Fáze cyklu*heterozygotnost a atraktivita hlasu:	folikulární	homozygot	3,842
		heterozygot	3,468
	luteální	homozygot	3,561
		heterozygot	3,462

Tab. 15 Hodnoty estimated marginal means pro vliv interakce fáze cyklu s heterozygotností na hodnocení atraktivity hlasu.

Post-hoc testy:

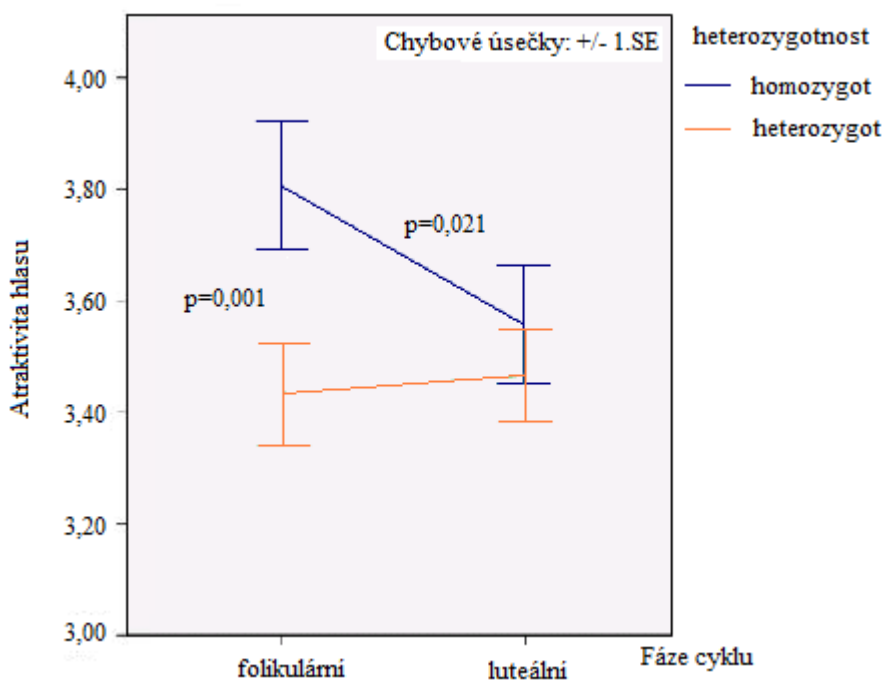
Bylo zjištěno signifikantně vyšší v hodnocení atraktivity hlasu homozygotů ze strany žen ve folikulární fázi než ze strany žen v luteální fázi cyklu ($t(36)=2,423$; $p=0,021$).

Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnocení atraktivity hlasu heterozygotů mezi folikulární a luteální fázi cyklu ($t(36)=-0,409$; $p=0,685$).

Hlas homozygotů byl ženami ve folikulární fázi hodnocen signifikantně jako více atraktivní než hlas heterozygotů ($t(44)=3,626$; $p=0,001$).

Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnocení atraktivity hlasu homozygotů a heterozygotů ženami v luteální fázi cyklu ($t(43)=0,830$; $p=0,411$).

Ve folikulární fázi menstruačního cyklu ženy preferují hlasy homozygotů před hlasy heterozygotů a hodnotí hlasy homozygotů signifikantně jako atraktivnější než ženy v luteální fázi cyklu. U heterozygotů k signifikantní změně hodnocení atraktivity hlasu ze strany žen ve folikulární a v luteální fázi cyklu nedochází (Graf 6).



Graf 6 Vliv interakce faktorů fáze cyklu a heterozygotnosti na hodnocení atraktivity hlasu. Ženy ve folikulární fázi cyklu hodnotí hlasy homozygotů signifikantně jako více atraktivní než hlasy heterozygotů ($p=0,001$) a toto hodnocení homozygotů je signifikantně vyšší než u žen ve fázi luteální ($p=0,021$). Chybové úsečky znázorňují +/- 1 stř. chybu průměru.

5.5 Vliv pořadí testování

Analýza vlivu pořadí sezení proběhla mimo celkový model, výsledkem je signifikantní vliv within-subject faktoru, což je v této analýze pořadí sezení ($\lambda^2=0,742$; $F(3,34)=3,951$; $p=0,016$) (Tab. 16). Z toho plyne, že při hodnocení všech tří smyslových modalit hrálo roli, zda žena hodnotila poprvé nebo opakovaně.

Celkový vliv faktoru:	λ^2	F (3,34)	p	part. Eta sq.
Sezení	0,742	3,951	0,016	0,258

Tab. 16 Výsledky GLM modelu týkající se vlivu within-subjects faktoru (sezení) byly při hodnocení atraktivitu, bez ohledu na konkrétní závislou proměnnou, signifikantní (vyznačeno žlutě). Uvádím zde hodnoty F a p, které odpovídají 3,34 stupňům volnosti. Signifikantní výsledky jsou vyznačeny žlutě. Dále jsou v tabulce uvedeny hodnoty Wilks'lambda (λ^2) a part. Eta square.

Vliv pořadí sezení na hodnocení atraktivitu je dále rozdělen pro jednotlivé konkrétní závislé proměnné, kde mě zajímalo, jak pořadí sezení ovlivnilo hodnocení atraktivitu pachu, atraktivitu tváře a atraktivitu hlasu (Tab. 17). Pro hodnocení jednotlivých závislých proměnných je vliv pořadí sezení signifikantní pouze v případě hodnocení atraktivitu tváře ($F(1,33)=10,161$; $p=0,003$), celkový vliv pořadí sezení na hodnocení atraktivitu byl pravděpodobně způsoben právě hodnocením atraktivitu tváře (Graf 7).

Vliv faktoru sezení na atraktivitu:	F (1,33)	p	part. Eta sq.
pachu	2,476	0,124	0,064
tváře	10,161	0,003	0,220
hlasu	2,230	0,144	0,058

Tab. 17 Výsledky vlivu faktoru sezení na hodnocení atraktivitu pachu, tváře a hlasu. Signifikantní rozdíl mezi hodnocením během prvního a druhého sezení je zvýrazněn žlutě. V tabulce jsou uvedeny hodnoty part. Eta square, statistiky F a p, které odpovídají 1,33 stupňům volnosti.

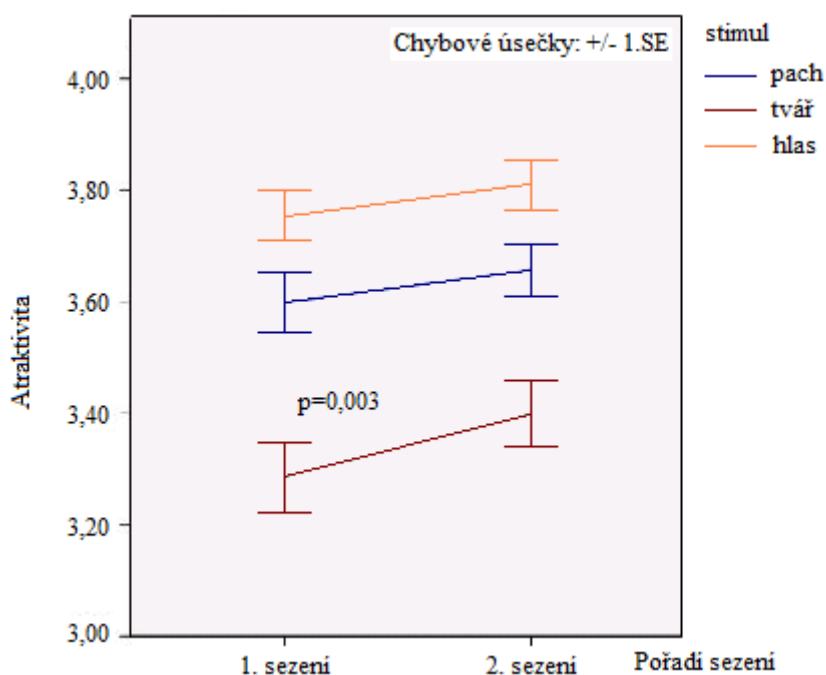
Pro lepší pochopení vlivu pořadí sezení na hodnocení atraktivitu použijeme estimated marginal means (Tab. 18). U všech závislých proměnných dochází ke změně v hodnocení mezi

prvním a druhým sezení stejným směrem, a to tak, že během druhého hodnocení dávají ženy vyšší hodnoty. U hodnocení atraktivity tváře je tento trend nejvýraznější.

Sezení:	Estimated Marginal Means (EMM)		
	atraktivita pachu	atraktivita tváře	atraktivita hlasu
první	3,147	2,567	3,508
druhé	3,302	2,799	3,623

Tab. 18 Hodnoty estimated marginal means pro hodnocení atraktivity během prvního a druhého sezení. Rozdíl je signifikantní pouze u hodnocení atraktivity tváře ($p=0,003$).

Ženy během druhého sezení hodnotí stimuly jako atraktivnější a tento trend se nejvýrazněji projevil u hodnocení atraktivity tváří (Graf 7).



Graf 7 Rozdíl v hodnocení atraktivity všech závislých proměnných během prvního a druhého sezení. U hodnocení atraktivity tváře (hnědá linie) je tato změna mezi prvním a druhým sezením signifikantní ($p=0,003$). Chybové úsečky znázorňují +/- 1 střední chybu průměru.

6. Diskuze

Diskuzi jsem se rozhodla uspořádat podle jednotlivých cílů práce, které jsem si vytyčila. Samozřejmě se ale jednotlivé otázky prolínají a nelze hledat vysvětlení pro výsledky týkající se jedné otázky, aniž bych současně neodpovídala i na ostatní.

Liší se atraktivita heterozygotů a homozygotů?

Pokud se podíváme na celkové hodnocení heterozygotů a homozygotů, dochází během hodnocení k preferencím ve prospěch homozygotů. Když se zaměříme na jednotlivé sledované stimuly, signifikantní vliv nacházíme pouze v případě hodnocení atraktivity hlasu, a to také ve prospěch homozygotů. Preference pro hlas homozygotů se projevily především ve folikulární fázi cyklu. Podobný nárůst preferencí pro homozygoty ze strany žen ve folikulární fázi cyklu oproti hodnocení žen v luteální fázi cyklu jsme zaznamenali i u atraktivity tváří, nicméně rozdíl v atraktivitě homozygotů a heterozygotů nebyl v tomto případě signifikantní.

Naše výsledky, tedy zjištěné preference ve prospěch homozygotů, jsou v rozporu s naším původním předpokladem. Ten byl založen na teoretických podkladech a výsledcích dřívějších studií, kdy například Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003) zjistili vyšší atraktivitu pachu mužů, kteří byli heterozygotní v lokusu HLA -B. Co se týče atraktivity tváře, vyšší atraktivita tváří heterozygotů byla zjištěna i Craigem Robertsem a kol. (Roberts *et al.* 2005a). V tomto případě byli, stejně jako v naší studii, dáni všichni homozygoti pro analýzu do jedné skupiny, což bylo, stejně jako v našem případě, z důvodu nízkého počtu mužů, kteří by byli homozygotní ve více než jedné alele. Lie a kol. (Lie *et al.* 2007, 2008) našli podobné výsledky – pozitivní korelaci mezi atraktivitou tváří mužů a heterozygotností v genech HLA. Ve studii od Coetzee a kol. (Coetzee *et al.* 2007) nebyla žádná závislost mezi heterozygotností HLA genů a atraktivitou zjištěna, ale v žádné studii zatím nevyšly signifikantní preference ve prospěch homozygotů.

Naši účastníci výzkumu byli všichni dárči krve, tudíž zdraví jedinci, kteří již prošli určitou selekcí na UHKT. Je tedy možné, že v našem případě byli homozygotní jedinci sice v alelách MHC méně variabilní, ale na druhou stranu nesli ideální kombinaci MHC alel pro dané podmínky. Pak mohlo docházet k jejich preferování, neboť by nesli právě ty správné alely. Jednalo by se tedy o preference specifických kombinací alel, které jsou momentálně nejvýhodnější. Tuto možnost podporuje výzkum, který ukazuje, že existuje souvislost mezi

konkrétními MHC alelami a lepší obranyschopností proti malárii (Hill *et al.* 1991). Také tuto hypotézu podporuje i výsledek nedávno publikovaného výzkumu Charbonnel a kol. (Charbonnel *et al.* 2010), který se uskutečnil na hryzci vodním (*Arvicola terrestris scherman*). Nalezli zde negativní vztah mezi MHC heterozygotností a reakcí na toxický lecitin fytohemaglutinin, který se běžně používá na testování kvality imunitního systému ptáků (např. Bonato *et al.* 2009), V případě hryzců pak homozygot se specifickými alelami MHC na fytohemaglutinin reagoval dobře.

Rovněž je možné, že příliš vysoká variabilita MHC alel jedince může vést naopak k nižší obranyschopnosti imunitního systému z důvodu probíhající negativní selekce. Naše výsledky podporují tvrzení, že dosáhnout optimální úrovně MHC variability je užitečnější než se snažit dosáhnout úrovně maximální (Nowak *et al.* 1992).

Předchozí studie Craiga Robertse a kol. (Roberts *et al.* 2005b) ukázala opačné preference při hodnocení atraktivity tváře, než jaké se projevují u atraktivity pachu, kdy tváře mužů, se kterými hodnotící ženy sdílely více alel, byly hodnoceny jako atraktivnější. Tvář a hlas si jsou podobné v tom, že na ženu působí již na dálku, zatímco na pach žena reaguje až z větší blízkosti. Signály fungující na dálku a nablízko mohou jít proti sobě a je možné, že opačné preference u těchto stimulů povedou ve svém výsledku ke střední míře variability, stejně jako mohou vést ke střední hladině podobnosti MHC genů. To by mohlo vysvětlovat, proč byly preferované hlasy homozygotů, ačkoli jsme očekávali spíše preference pro heterozygoty.

Snahu o dosažení spíše střední než maximální míry variability ukazuje i výzkum Aeschlimanna a kol. (Aeschlimann *et al.* 2003), v němž bylo zjištěno, že samice koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) se snaží kompletovat svou variabilitu MHC genů tak, aby dosáhla optimálního stavu. Samice, která má nízkou variabilitu MHC genů tedy preferuje samce, který je v genech MHC variabilnější a naopak, samice s vysokou variabilitou MHC genů preferují samce s nižší variabilitou. Snahu o střední variabilitu zaznamenali ve své studii i Reusch a kol. (Reusch *et al.* 2001), kdy samice koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) vybírala partnera tak, aby vhodně doplnila svou variabilitu MHC genů na ideální úroveň.

Je ale také pravda, že obecně máme o MHC komplexu poměrně malé znalosti. Tento komplex je dobře popsán u člověka, dále byl osekvenován například u myši, potkana či slepice a ukázalo se, že se u jednotlivých druhů poměrně liší. Je tedy otevřenou otázkou, zda se můžeme

odkazovat na studie provedené na rybách, ptácích či savcích zároveň, když se tyto živočichové nápadně liší ve své evoluční historii, etologii i péči o potomstvo.

Nevíme také, jaké má na výsledky vliv to, na kterém konkrétním lokusu je daný jedinec homozygotní, a zda se jedná pouze o jeden lokus. S tím souvisí studie týkající se atraktivity pachu, kterou uskutečnil Randy Thornhill a kol. (Thornhill *et al.* 2003), jejímž výsledkem byla pozitivní korelace mezi heterozygotností lokusu B u mužů a jejich atraktivitou. V našem případě nebyl žádný muž homozygotní pouze v lokusu B, jediní dva homozygoté v lokusu B byly zároveň homozygotní v lokusu DR (kap. 4.1.1), pokud má tedy právě lokus B na hodnocení výrazný vliv, nemohl se zde projevit. Podobná situace nastala i v případě mužů, kteří jsou homozygotní ve více než jedné alele. Takoví jsou v naší studii opět pouze dva, případný vliv homozygotnosti ve více alelách se tedy nemohl příliš projevit.

Liší se hodnocení atraktivity heterozygotů a homozygotů ve folikulární a v luteální fázi menstruačního cyklu?

Signifikantní vliv fáze cyklu na hodnocení atraktivity (bez ohledu na heterozygotnost) nebyl zjištěn ani u jedné z modalit, u hlasu se výsledek blížil hladině signifikance. Následné testy ukázaly, že dochází ke změně hodnocení atraktivity hlasu mezi folikulární a luteální fází cyklu, kdy ženy ve folikulární fázi cyklu hodnotí hlas vyššími známkami.

Změny v hodnocení heterozygotů a homozygotů byly během menstruačního cyklu zaznamenány u atraktivity tváře a hlasu, nikoli ale u hodnocení atraktivity pachu. Co se týče atraktivity tváře, docházelo během folikulární fáze k nárůstu hodnocení homozygotů v porovnání s luteální fází cyklu. Z grafu (Graf 2) vidíme, že podobně (ačkoli ne signifikantně) se zvýšily také preference pro heterozygoty, nedochází zde tedy k signifikantní preferenci homozygotů před heterozygoty. K takové změně ale dochází u atraktivity hlasu, kdy ženy ve folikulární fázi preferují hlasy homozygotů před hlasy heterozygotů. Podobně jako u hodnocení tváře, ženy ve folikulární fázi hodnotí tváře homozygotů pozitivněji než v luteální fázi cyklu.

Lepší hodnocení hlasu ve folikulární fázi cyklu můžeme vysvětlit tím, že se jedná o více senzibilní fázi cyklu, kdy se kolem období ovulace zvyšuje pravděpodobnost početí. Citlivost vůči atraktivitě potenciačního partnera se tedy v této fázi cyklu zvyšuje (Gangestad & Thornhill 2008). Je ale otázkou, proč se změna projevila pouze u hodnocení atraktivity hlasu.

S tím souvisí i vysvětlení vyšších preferencí během folikulární fáze cyklu oproti luteální fázi cyklu, které se projevily v případě hodnocení hlasů a tváří homozygotů. Vzhledem k výsledkům předchozích studií (Thornhill *et al.* 2003, Roberts *et al.* 2005a, Lie *et al.* 2007, 2008), jsme předpokládali preference posunuté ve prospěch heterozygotů. Pokud bychom vycházeli ale z předpokladu, že naši testovaní homozygoté jsou nositeli ideální kombinace alel pro dané podmínky, můžeme preference pro homozygoty vysvětlit skrze hypotézu, že dochází k preferování spíše specifických kombinací alel.

Jak hodnotí atraktivitu ženy užívající hormonální antikoncepci a ženy cyklující?

Vliv užívání hormonální antikoncepce na hodnocení atraktivity homozygotů a heterozygotů jsme neprokázali a je zajímavé, že podobné změny preferencí, které můžeme pozorovat u žen cyklujících, jsme zaznamenali i u žen, které užívají hormonální antikoncepci. U obou skupin žen docházelo ke změnám v hodnocení atraktivity homozygotů během cyklu, což je v rozporu s naším očekáváním.

U hodnocení atraktivity hlasu (bez ohledu na heterozygotnost) můžeme vidět, že zatímco u žen cyklujících došlo ke změně mezi folikulární a luteální fází cyklu, u žen, které užívají hormonální antikoncepci, k podobné změně nedošlo. Tuto neměnnost v hodnocení žen užívajících hormonální antikoncepci jsme zde očekávali, jelikož hormonální antikoncepce udržuje stálou hladinu pohlavních hormonů (progesteronu a estrogeneru) v těle. Rozdíl v hodnocení ve folikulární fázi cyklu mezi ženami, které užívají hormonální antikoncepci, a ženami přirozeně cyklujícími bychom mohli vysvětlit právě změnou hladiny estrogeneru a progesteronu ve folikulární fázi cyklu u přirozeně cyklujících žen. Tato změna koncentrace progesteronu a estrogeneru předchází ovulaci, kdy je nejvyšší pravděpodobnost početí a žena je aktivnější při hledání partnera, přičemž vnímání jeho atraktivity se mění (Gangestad *et al.* 2007). U žen, které užívají hormonální antikoncepci, ke změně hladiny nedochází a také se u nich hodnocení atraktivity hlasu v luteální a ve folikulární fázi příliš neliší. Souvislost s hormonální hladinou potvrzují i výsledky hodnocení atraktivity hlasu, ve kterém ženy v luteální fázi cyklu a ženy užívající hormonální antikoncepci hodnotí atraktivitu podobně, zcela odlišné je přitom hodnocení přirozeně cyklujících žen ve folikulární fázi menstruačního cyklu. Odlišné hodnocení přirozeně cyklujících žen ve folikulární a v luteální fázi se projevuje ve více modalitách (Gangestad *et al.* 2007) a právě hormonální antikoncepce může mít vliv na tyto přirozené změny během cyklu

(Alvergne & Lummaa 2010). Ženy ve folikulární fázi například více preferují dominantní partnery (Gangestad & Thornhill 1998) a partnery s lepším společenským vystupováním (Gangestad *et al.* 2004), preferují maskulinní tváře mužů (Johnston *et al.* 2001), hluboké hlasy (Puts 2005) a upřednostňují u mužů kreativitu a talent před majetkem (Haselton & Miller 2006). Všechny tyto preference se projevují pouze, pokud žena hodnotí atraktivitu krátkodobého partnera, v případě hodnocení atraktivity dlouhodobého partnera nebyly tyto změny v průběhu cyklu pozorovány (Gangestad *et al.* 2007) Ženy ve folikulární fázi cyklu jsou tedy vnímavější vůči znakům typickým pro krátkodobého partnera (Gangestad & Thornhill 1998). Thornhill a kol. našli ve své studii preference pro tváře heterozygotů silnější mimo fertilní fázi cyklu, je tedy možné, že by heterozygoté byli preferovanější spíše jako dlouhodobí partneři (Thornhill *et al.* 2003).

Positivní hodnocení u cyklujících žen můžeme pozorovat především ve folikulární fázi cyklu, kdy je zájem o potenciačního partnera teoreticky největší, a kdy se také nejvíce lišilo hodnocení žen cyklujících a užívajících hormonální antikoncepci v případě atraktivity hlasu. To podporuje hypotézu, že ženy přirozeně cyklující jsou více vnímavé a aktivní při hledání partnera než ženy užívající hormonální antikoncepci. Ženy, které užívají hormonální antikoncepci, se projevují v hodnocení více kriticky. Snížený zájem o potenciačního partnera může být způsoben tím, že hormonální antikoncepce navozuje v organismu stav podobný těhotenství (Wedekind *et al.* 1995).

Má na hodnocení atraktivity vliv pořadí sezení?

Analýza ukázala, že na obecné hodnocení atraktivity má pořadí testování signifikantní vliv. Pokud se podíváme na rozdíly v hodnocení pachu a hlasu mezi prvním a druhým sezením, nezjistíme signifikantně průkazný posun, ale přesto jsou tendence k vyššímu hodnocení během druhého sezení u žen patrné. V případě hodnocení tváří je tento rozdíl signifikantní a můžeme říci, že ženy během druhého sezení hodnotily tváře jako atraktivnější.

Tuto změnu v hodnocení můžeme vysvětlit také primingem (nevědomé vtisknutí do paměti), přičemž u tváří můžeme tento efekt očekávat nejsilnější, kdy tváře viděné opakovaně jsou hodnoceny jako atraktivnější (Rhodes *et al.* 2005). Je tedy možné, že si ženy během druhého hodnocení tváře pamatovaly a i tváře, které jsou nám pouze povědomé, jsou hodnoceny lépe (Cooper & Maurer 2008).

Vyšší hodnoty u všech tří sledovaných stimulů během druhého sezení můžeme vysvětlit také tím, že ženy již znaly průběh testování, a také se mohl snížit stres z neznámého prostředí. Při prvním sezení ženy totiž nevěděly, jak přesně bude testování probíhat a neznaly dané prostředí. Podruhé už oba tyto aspekty působily podstatně méně rušivě. S tím souvisí i možné vysvětlení, že ženy při druhém testování již znaly „nabídku“ vzorků a uzpůsobily jí podvědomě své očekávání a nároky, takže hodnotily lépe. Se zjištěným rozdílem mezi prvním a druhým sezením souvisí i fakt, že během prvního sezení bylo více testujících žen v luteální fázi cyklu.

Pachové vzorky mohla také ovlivnit změna teploty, která byla v průběhu druhého testování vyšší. To by způsobilo vyšší intenzitu pachových vzorků, což by ale mohlo být výhodné v případě, že by naše testované vzorky byly příliš slabě cítit. Navíc teplejší počasí může mít vliv na náladu a fyzickou únavu hodnotitelek.

Rozdíl mezi hodnocenými stimuly

Hlavní otázkou zůstává, proč se víceméně všechny sledované změny projevily právě na atraktivitě hlasu. Například signifikantní preference homozygotů ukázaly naše výsledky pouze v případě nahrávek hlasu.

U mnoha druhů samice preferují znaky, které jsou ukazatelé vysoké hladiny androgenů, z nichž nejznámější je testosteron. Tyto znaky fungují jako signály genetické kvality samce, neboť androgeny utlumují imunitní systém (Grossman 1985), a jako takové mohou být tedy produkovány pouze zdravými jedinci (Folstad & Karter 1992). Studie Dabbs a Mallingera (Dabbs & Mallinger 1999), které se zúčastnilo 61 mužů a 88 žen, zjistila, že hladina testosteronu negativně koreluje s výškou hlasu u mužů, ale nikoli u žen. Následně se ukazuje, že ženy hodnotí muže s hlubšími hlasy jako atraktivnější, maskulinější a zdravější (Collins 2000). Také Puts (Puts 2005) ve své studii zjistil, že hluboký hlas je preferovaný především u krátkodobého partnera, a tato preference se projeví nejvíce u žen v období ovulace. Navíc v této studii muži s hlubším hlasem uváděli více sexuálních zkušeností. Studie, které by se zabývaly atraktivitou hlasu a MHC geny, dosud chybí, naše výsledky ale naznačují, že by homozygoté se specifickými alelami mohli, jakožto zdravější jedinci, produkovat více testosteronu, a tudíž se prezentovat hlubším hlasem, který je hodnocen jako atraktivnější.

Naše výsledky ukazují, že heterozygotnost nemá vliv na atraktivitu tváře ani pachu. Je možné, pokud opět vyjdeme z předpokladu, že dárci krve musí splňovat určitá zdravotní kritéria,

že došlo výběrem zdravých jedinců k setření rozdílů mezi běžnými homozygoty a heterozygoty, které by jinak rozdílly ve zdravotním stavu, které souvisejí s obranyschopností imunitního systému, vyvolaly. Lepší zdravotní stav obou skupin mužů by se mohl projevit právě na tváři a pachu, neboť právě pach a pleť na něj pružně reagují. Navíc hodnocení pachu je výrazně závislé na momentální kondici hodnotitelky a pachové stimuly jsou nejvíce náchylné ke změnám kvůli prostředí a rušivým proměnným (např. teplota). Hodnocení tedy nemusí být zdaleka ovlivněno jen hormonální situací, ale i fyzickou únavou nebo asociacemi, kdy se k pachům snadno vážou různé pozitivní i negativní vzpomínky (Wedekind & Furi 1997).

7. Závěr

Naše výsledky ukázaly především preference posunuté ve prospěch homozygotů, a tyto preference se výrazněji projeví u žen ve folikulární fázi cyklu. U konkrétních stimulů se tyto faktory projeví v případě atraktivity hlasu, kdy o atraktivitě hlasu můžeme říci, že bez ohledu na fázi cyklu i užívání hormonální antikoncepce, byly preference posunuty ve prospěch homozygotů. Ženy ve folikulární fázi cyklu také preferovaly více hlasy homozygotů před hlasy heterozygotů.

U tváří se projevil pouze posun k lepšímu hodnocení atraktivity homozygotů ze strany žen ve folikulární fázi cyklu než ze strany žen v luteální fázi cyklu. U atraktivity tváří však, narozdíl od atraktivity hlasu, nebyl zjištěn rozdíl mezi heterozygoty a homozygoty

Signifikantní rozdíl mezi hodnocením žen přirozeně cyklujících a žen, které užívají hormonální antikoncepci, jsme nezjistili. U přirozeně cyklujících žen docházelo ke změně hodnocení v případě atraktivity hlasu, a to mezi folikulární a luteální fází cyklu, kdy ve folikulární fázi hodnotily ženy hlas jako atraktivnější. Ženy cyklující a ženy užívající hormonální antikoncepci se lišily v hodnocení atraktivity hlasu během folikulární fáze cyklu, během luteální fáze jsme rozdíl mezi jejich hodnoceními nezjistili.

Zaznamenali jsme také vliv pořadí testování na hodnocení. Přestože je hodnocení atraktivity během druhého sezení vyšší u všech sledovaných proměnných, pouze u hodnocení atraktivity tváře je posun k lepšímu hodnocení atraktivity během druhého sezení statisticky průkazný.

Použitá literatura

- Aeschlimann, P.B., Haberli, M.A., Reusch, T.B.H., Boehm, T., Milinski, M. (2003) Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection, *Behav. Ecology and Sociob.* 54: 119-126
- Alvergne, A., Lummaa, V. (2010) Does the contraceptive pill alter mate choice in humans? *Trends in Ecol. and Evol.* 25: 171-179
- Apanius, V., Penn, D., Slev, P., Ruff, L. R., Potts, W. K. (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex, *Crit. Rev. Immunol.* 17: 179-224
- Barrett, L., Dunbar, R., Lycett, J. (2001) *Human Evolutionary Psychology*, Palgrave Macmillan
- Bensafi, M., Brown, W.M., Khan R., Levenson, B., Sobel, N. (2004) Sniffing human sex-steroid derived compounds modulates mood, memory and autonomic nervous system function in specific behavioral contexts, *Behavioural Brain Research* 152: 11-22
- Beydoun, H., Saftlas, A. F. (2005) Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions, *Tissue Antigens* 65: 123–135
- Bonato, M., Evans, M.R., Hasselquist, D., Cloete, S.W.P., Cherry, M.I. (2009) Growth rate and hatching date in ostrich chicks reflect humoral but not cell-mediated immune function, *Behav. Ecol. and Sociobiol.* 64: 183-191
- Brown, J.L. (1995) A theory of mate choice based on heterozygosity, *Behav. Ecology* 8: 60-65
- Brown, J.L. (1999) The new heterozygosity theory of mate choice and the MHC, *Genetica* 104: 215-221
- Brown, J.L., Eklund, A. (1994) Kin recognition and the major histocompatibility complex: An Integrative review, *Am. Naturalist* 143: 435-461
- Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Buchbinder, S., Hoots, K., O'Brien S.J. (1999) HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage, *Science* 283: 1748-1752
- Coetzee, V., Barrett, L., Greeff, J.M., Henzi, S.P., Perrett, D.I., Wade, A.A. (2007) Common HLA alleles associated with health, but not with facial attractiveness, *PLoS ONE* 7:e640
- Collins, S.A. (2000) Men's voices and women's choices, *Anim. Behav.* 60: 773–780
- Cooper, P.A., Maurer, D. (2008) The influence of recent experience on perceptions of attractiveness, *Perception* 37: 1216-1226

- Dabbs, J.M., Mallinger, A. (1999) High testosterone levels predict low voice pitch among men, *Personality and Individual Differences* 27: 801-804
- Darwin, Ch. (1871) *The Descent of Man*, London: John Murray (reprint: 2006, O původu člověka, Academia)
- Eggert, F., Ferstl, R., Müller-Schwarze, D. (1999) MHC and olfactory communication in humans, In: Johnston, R.E., Müller-Schwarze, D., Sorensen, P.W. (Eds.), *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*, New York, *Kluwer Academic*, 181-207
- Egid, K., Brown, J.L. (1989) The major histocompatibility complex and female mating preferences in mice, *Anim. Behav.* 38: 548-550
- Eklund, A. (1997a) The effect of early experience on MHC-based mate preferences in two B10.W strains of mice (*Mus domesticus*), *Behavioral Genetics* 27:223-229, In: Penn, D. J., Potts, W. K. (1999) The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes, *The Am. Naturalist* 153: 145-164
- Eklund, A. (1997b) The major histocompatibility complex and mating preferences in wild house mice (*Mus domesticus*), *Behavioral Ecology* 8: 630-634
- Eklund, A., Egid, K., Brown, J. L. (1991) The major histocompatibility complex and mating preferences of male mice, *Animal Behaviour* 42: 693-994
- Fink, B., Neave, N., Manning, J.T., Grammer, K. (2006) Facial symmetry and judgements of attractiveness, health and personality, *Personality and individual differences* 41: 491-499
- Folstad, I., Karter, A.J. (1992) Parasites, bright males and the immuno-competence handicap, *American Naturalist* 139: 603–622
- Gangestad, S. W., Thornhill, R. (1998). Menstrual cycle variation in women's preference for the scent of symmetrical men, *Proc. R. Soc. Lond B* 262: 727-733
- Gangestad, S.W., Garver-Apgar, C.E., Simpson, J.A., Cousins, A.J. (2007) Changes in women's mate preferences across the ovulatory cycle, *Journal of Personality and Social Psychology* 92: 151-163
- Gangestad, S.W., Simpson, J.A., Cousins, A.J., Garver-Apgar, C.E., Christensen, P.N. (2004) Women's preferences for male behavioral displays change across the menstrual cycle, *Psychological Science* 15: 203–207
- Gangestad, S.W., Thornhill, R. (2008) Human oestrus, *Proc. R. Soc. Lond. B* 275: 991-1000

- Gangestad, S.W., Thornhill, R., Garver, C.E. (2002) Changes in women's sexual interests and their partners' mate-retention tactics across the menstrual cycle: evidence for shifting conflicts of interest, *Proc. R. Society of London B* 269: 975-982
- Gangestad, S.W., Thornhill, R., Garver, C.E. (2005) Adaptations to ovulation - Implications for sexual and social behavior, *Curr. Direct. in Psychol. Science* 14: 312-316
- Garver-Apgar, C. E., Gangestad, S. W., Thornhill, R., Miller, R. D., Olp, J. J. (2006) Major histocompatibility complex alleles, sexual responsivity, and unfaithfulness in romantic couples, *Psychol. Sci.* 17: 830-835
- Giphart, M.J., D'Amato, J. (1983) HLA and reproduction? *Journal Immunogen.* 10: 25-29
- Grossman, C.J. (1985) Interaction between the gonadal steroids and the immune system, *Science* 227: 257-261
- Haselton, M.G., Miller, G.F. (2006) Women's fertility across the cycle increases the short-term attractiveness of creative intelligence compared to wealth, *Human Nature* 17: 50-73
- Havlíček, J., Lenochová, P. (2006) The effect of meat consumption on body odor attractiveness, *Chemical Senses* 31: 747-752
- Havlíček, J., Roberts, S.C. (2009) MHC correlated mate choice in humans: A review, *Psychoneuroendocrinology* 34: 497-512
- Havlíček, J., Roberts, S.C., Flégr, J. (2005) Women's preference for dominant male odour: effects of menstrual cycle and relationship status, *Biol. Lett.* 1: 256-259
- Hedrick, P.W., Black, F.L. (1997) HLA and mate selection: No evidence in South Amerindians, *Am. J. Hum. Genet.* 61: 505-511
- Hill, A.V.S. (1999) Genetics and genomics of infectious disease susceptibility, *British Medical Bulletin* 55: 401-413
- Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J., Greenwood, B.M. (1991) Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria, *Nature* 352: 595-600
- Chaix, R., Cao, Ch., Donnelly, P. (2008) Is Mate Choice in Humans MHC-Dependent? *PLoS Genet* 4: e1000184. doi:10.1371/journal.pgen.1000184
- Charbonnel, N., Bryja, J., Galan, M., Deter, J., Tollenaere, C., Chaval, Y., Morand, S., Cosson, J.F. (2010) Negative relationships between cellular immune response, MHC class II

- heterozygosity and secondary sexual trait in the montane water vole, *Evol. Applications* 3: 279-290
- Ihara, Y., Aoki, K., Tokunaga, K., Takahashi, K. Juji, T. (2000) HLA and human mate choice: tests on Japanese couples, *Anthropol. Science* 108: 199-214
- Jacob, S., McClintock, M.K., Zelano, B., Ober, C. (2002) Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor, *Nature Genetics* 30: 175-180
- Janeway, C.A. (1993) How the immune system recognizes invaders, *Scientific American* 269: 73-79
- Jiang, X.W., Fares, M.A. (2010) Identifying coevolutionary patterns in human leukocyte antigen (HLA) molecules, *Evolution* 64: 1429-1445
- Jin, K., Ho, H.-N., Speed, T.P., Gill, T.J. (1995) Reproductive Failure and the Major Histocompatibility Complex, *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1456-1467
- Johnston, V.S., Hagel, R., Franklin, M., Fink, B., Grammer, K. (2001) Male facial attractiveness: Evidence for hormone mediated adaptive design, *Evolution and Human Behavior* 21: 251–267
- Jones, B.C., Little, A.C., Feinberg, D.R., Penton-Voak, I.S., Tiddeman, B.P., Perrett, D.I. (2004) The relationship between shape symmetry and perceived skin condition in male facial attractiveness, *Evol. Hum. Behaviour* 25: 24–30
- Jordan, W.C., Bruford, M.W. (1998) New perspectives on mate choice and the MHC, *Heredity* 81: 239-245
- Kimoto, H., Haga, S. Sato, K., Touhara, K. (2005) Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons, *Nature* 437: 898-901
- Langefors., A., Lohm, J., Grahn, M., Andersen, O., Schantz, T. (2001) Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Proc. R. Soc. Lond B* 268: 479-485
- Leinders-Zufall, R., Brennan, P., Windmayer, P., Chandramani, P., S., Maul-Pavicic, A., Jager, M., Xiao-Hong Li, Breer, H., Zufall, F., Boehm, T. (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ, *Science* 306: 1033-1037
- Lenochová, P., Roberts, S.C., Havlíček, J. (2009) Methods in body odor sampling: The effect of sampling length, *Chemical Senses* 34: 127-138

- Li, X.C., Raghavan, M. (2010) Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens, *Current opinion in organ transplantation* 15: 499-504
- Lie, H., Simmons, L., Rhodes, G. (2007) More than just a pretty face? Heterozygosity and facial attractiveness. Presentation at the meeting of the Association for the Study of Animal Behaviour, Newcastle-upon-Tyne, 5-7th September. In: Havlíček, J., Roberts, S.C. (2009) MHC correlated mate choice in humans: A review, *Psychoneuroendocrinology* 34: 497-512
- Lie, H.C., Rhodes, G., Simmons, L.W. (2008) Genetic diversity revealed in human faces, *Evolution* 62: 2473-2486
- Lie, H.C., Simmons, L.W., Rhodes, G. (2009) Does Genetic Diversity Predict Health in Humans? *PLoS ONE* 4: e6391. doi:10.1371/journal.pone.0006391
- Lie, H.C., Simmons, L.W., Rhodes, G. (2010a) Is genetic diversity associated with mating success in humans? *Animal Behav.* 79: 903–909
- Lie, H.C., Simmons, L.W., Rhodes, G. (2010b) Genetic dissimilarity, genetic diversity, and mate preferences in humans, *Evol. Hum. Behav.* 31: 48-58
- Little, A.C., Burt, D.M., Penton-Voak, I.S., Perrett, D.I. (2001) Selfperceived attractiveness influences human female preferences for sexual dimorphism and symmetry in male faces, *Proc. Royal Soc. London B* 268: 39–44
- Little, A.C., Jones, B.C., Burt, D.M., Perrett, D.I. (2007) Preferences for symmetry in faces change across the menstrual cycle, *Biol. Psychol.* 76: 209-216
- Manning, J.T. (1995) Fluctuating asymmetry and bodyweight in men and women: implications for sexual selection, *Ethol. Sociobiol.* 16: 145–152
- Manning, J.T., Pickup, L.J. (1998) Symmetry and performance in middle distance runners, *Int. J. Sports Med.* 19: 205–209
- Milinski, M., Griffiths, S., Wegner, K.M., Reusch, T.B.H., Haas-Assenbaum, A., Boehm, T. (2005) Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands, *Proceed. Nat. Academy of Sci. USA* 102:4414–4418
- Mlčoch, Z., MUDR. Zbyněk Mlčoch [online]. c2003 [cit. 2010-08-30]. Co je to menstruace, menstruační cyklus, fáze menzes. Dostupné z WWW: <http://www.zbynekmlcoch.cz/info/anatomie_jak_funguje_lidske_telo/co_je_to_menstruace_menstruacni_cyklus_faze_menzes.html>

- Møller, A., Swaddle, J. (1997) Developmental stability and evolution, *Oxford University Press*, Oxford
- Monti-Bloch, L., Jennings-White, C., Dolberg, D.S., Berliner, D.L. (2003) The human vomeronasal system, *Psychoneuroendocrinology* 19: 673-686
- Nordlander, C., Hammarström, L., Lindblom, B., Edvard Smith, C.I.E. (1983) No role of HLA in mate selection, *Immunogenetics* 18: 429-431
- Nowak, M.A., Tarczy-Hornoch, K., Austyn, J.M. (1992) The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10896-10899
- Ober, C., Weitkamp, L.R., Cox, N., Dytch, H., Kostyu, D., Elias, S. (1997) HLA and mate choice in humans, *Am. J. Hum. Genet.* 61: 497-504
- Pause, B.M., Krauel, K., Eggert, F., Müller, C., Sojka, B., Muller-Ruchholtz, W., Ferstl, R. (1999) Perception of HLA-related body odors during the course of menstrual cycle, *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 201-207
- Penn, D.J. (2002) The Scent of genetic compatibility: Sexual selection and major histocompatibility complex, *Ethology* 108: 1-21
- Penn, D.J., Potts, W.K. (1998) How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences?, *Advances in Immunol.* 69: 411-436
- Penn, D.J., Potts, W.K. (1999) The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes, *The Am. Naturalist* 153: 145-164
- Perrett, D.I., Burt, D.M., Penton-Voak, I.S., Lee, K.J., Rowland, D.A., Edwards, R. (1999) Symmetry and human facial attractiveness, *Evol. Hum. Behav.* 20: 295–307
- Perrett, D.I., Penton-Voak, I.S., Little, A.C., Tiddeman, B.P., Burt, D.M., Schmidt, N., Oxley, R., Kinloch, N., Barret, L. (2002) Facial attractiveness judgements reflect learning of parental age characteristics, *Proc. Royal Soc. B* 269: 873-880
- Potts, W. K., Manning, C. J., Wakeland, E.K. (1994) The role of infectious disease, inbreeding, and mating preferences in maintaining MHC diversity: an experimental test, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 346: 369-378
- Potts, W.K., Wakeland, E.K. (1990) Evolution of diversity at the major histocompatibility complex, *Trends Ecol. Evol.* 5: 181-187

- Puts, D.A. (2005) Mating context and menstrual phase affect women's preferences for male voice pitch, *Evolution and Human Behavior* 26: 388-397
- Puts, D.A., Gaulin, S.J.C., Verdolini, K. (2006) Dominance and the evolution of sexual dimorphism in human voice pitch, *Evolution and Human Behavior* 27: 283-296
- Reusch, T.B.H., Haberli, M.A., Aeschlimann, P.B., Milinski, M. (2001) Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism, *Nature* 414: 300-302
- Rhodes, G., Halberstadt, J., Jeffery, L., Palermo, R. (2005) The attractiveness of average faces is not a generalized mere exposure effect, *Soc. Cognition* 23: 205-217
- Roberts, S.C., Gosling, L.M., Carter, V., Petrie, M. (2008) MHC-correlated odour preferences in humans and the use of oral contraceptives, *Proc. Royal Soc. London B* 275: 2715-2722
- Roberts, S.C., Hale, M.L., Petrie, M. (2006) Correlations between heterozygosity and measures of genetic similarity: implications for understanding mate choice, *J. Evol. Biol.* 19: 558-569
- Roberts, S.C., Little, A.C., Gosling, L.M., B.C., Perrett, D.I., Carter, V., Jones, B.C., Penton-Voak, I., Petrie, M. (2005a) MHC-heterozygosity and human facial attractiveness, *Evol. of Human behavior* 26: 213-226
- Roberts, S.C., Little, A.C., Gosling, L.M., Jones, B.C., Perrett, D.I., Carter, V., Petrie, M. (2005b) MHC-assortative facial preferences in humans, *Biol. Lett.* 1:400-403
- Rosenberg, L.T., Cooperman, D., Payne, R. (1983) HLA and mate selection, *Immunogenetics* 17: 89-93
- Santos, P.S.C., Schinemann, J.A., Gabardo, J., Bicalho, M.D. (2005) New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students, *Hormones and Behavior* 47: 384-388
- Spehr, M., Kelliher, K.R., Li, X.H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. (2006) Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands, *Jour. of Neurosc.* 26: 1961-1970
- Swaddle, J.P., Cuthill, I.C. (1995) Asymmetry and human facial attractiveness: symmetry may not always be beautiful, *Proc. Royal Soc. London B* 261: 111-116
- Thornhill, R., Gangestad, S.W. (1999) Facial attractiveness, *Trends in Cogn.Sciences* 3: 452-469

- Thornhill, R., Gangestad, S.W., Miller, R., Scheyd, G., McCollough, J.K., Franklin, M. (2003) Major histocompatibility complex genes, symmetry, and body scent attractiveness in men and women, *Behavioral Ecology* 14: 668-678
- Thornhill, R., Møller, A.P. (1997) Developmental stability, disease and medicine, *Biol. rev.* 72: 497-548
- Wedekind, C., Furi, S. (1997) Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity?, *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 1471-1479
- Wedekind, C., Seebeck, T., Bettens, F., Paepke, A.J. (1995) MHC-dependent mate preferences in humans, *Proc. R. Soc. Lond. B* 260: 245-249
- Wedekind, C., Seebeck, T., Bettens, F., Paepke, A.J. (2006) The Intensity of human body odors and the MHC: Should we expect a link?, *Evol. Psychology* 4: 85-94
- Wobst, B., Zavazava, N., Luszyk, D., Lange, K., Ussat, S., Eggert, F., Ferstl, R., Müller-Ruchholtz, W. (1998) Molecular forms of soluble HLA in body fluids: potential determinants of body odor cues, *Genetica* 104: 275-283
- Yamazaki, K., Boyse, E.A., Mike, V., Thaler, H.T., Mathieson, B.J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z.A. (1976) Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.* 144: 1324-1335
- Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Andrews, P.W., Peake, B., Boyse, E.A. (1978) Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains, *Immunogenetics* 6: 253-259
- Zahavi, A. (1975) Mate selection - a selection for a handicap, *Journal of theoretical Biology* 53: 205-214
- Zelano, B., Edwards, S.V. (2002) An MHC component to kin recognition and mate choice in birds: Predictions, progress and prospects, *The Am. Naturalist* 160: 225-236