2. MIRIS

Sposobnost živih organizama u percipiranju različitih podražaja najznačajnija je karakteristika budući da organizmima osigurava preživljavanje i bolju kvalitetu života. Kod kukaca, kemijska osjetila imaju važnu ulogu tijekom razvoja, kao i u uspostavljanju i održavanju raznih fizioloških stanja i ekoloških interakcija. Osjetilo mirisa ili miris je primarni osjećaj koji kukci koriste kako bi analizirali okolinu u kojoj se nalaze. U posljednje vrijeme velika pozornost poklanja se istraživanju mirisnih osjetila kod kukaca. Osjetilni (mirisni) sustav kukaca pokazuje izrazitu sličnost u strukturi, funkciji i razvoju s ostalim beskralješnjacima, kao i kralježnjacima (Hildebrand & Shepherd, 1997). U usporedbi s kralježnjacima, osjetilni sustav kukaca sastoji se od relativno jednostavne, ali vrlo osjetljive mreže neurona (Stocker, 2001). Osim toga, kukci pokazuju različitu lepezu ponašanja koja su uvjetovana mirisnim podražajima, a koriste ih u inter-specifičnoj komunikaciji npr. pronalaženje hrane i intra-specifičnoj komunikacije npr. pronalaženje mjesta pogodnih za ovipoziciju, pronalaženje partnera i dr. (Hartlieb & Anderson, 1999).

Prirodni mirisni podražaji, kao što su miris cvijeća ili životinjski feromoni, obično su složene kombinacije mnogih kemijskih komponenata (Laurent, 2002). Mirisni spojevi emitirani od jednog izvora mirisa mogu imati raznoliku kemijsku strukturu (Knudsen i sur., 1993), te se svaki pojedini prisutni spoj može razlikovati kvantitativno od ostalih u različitim koncentracijama (Levin i sur., 2001). Mirisi također variraju u prostoru i vremenu s obzirom na prirodu medija u kojem je miris raspršen (Crimaldin, 2002).

2.1. Miris kao prirodni podražaj

Molekule mirisa su male organske molekule s molekulskom masom od 26-300g/mol (Mori i sur.,1998). Miris se sastoji od više milijuna hlapivih molekula koje se nalaze raspršene u mediju kao što su zrak ili voda. Tlak para molekula direktno utječe na promjenjivost molekula; mirisi s visokim tlakom para u okolišnim uvjetima isparavaju puno brže (Letcher i sur., 2004). Neživi mirisni izvori pasivno emitiraju mirise, dok živi mirisni izvori mogu biti aktivno ili pasivno emitirani. Intenzitet i kemijska struktura pasivne ili aktivne emisije mirisa uvelike ovisi o temperaturi i atmosferskom tlaku. Primjer neživog pasivnog emitiranja mirisa uključuju nepokretni objekt, kao što su vinske čaše koje emitiraju stotine spojeva s površine tekućine koje tvore određeni miris (Noble i sur., 2002). Živa emisija često je povezana s funkcijama metabolizma (Collins i sur., 2001). Sisavci emitiraju CO2 i mliječnu kiseline kao nusprodukt metabolizma; CO2 i mliječnu kiselinu koriste kukci, kao što su komarci, radi lakšeg pronalaženja domaćina (Dekker i sur., 2002). Prilikom aktivne emisije, mirisi su sintetizirani i emitirani od živog objekta, kao sintetizirani mirisi cvijeća (Dudareva & Pichersky, 2003; Piechulla & Pott, 2003), te feromoni kod životinja koji su produkti specifičnog žljezdanog tkiva (Foster, 2000).

2.2. Fizika mirisa: vrste mirisnih izvora

Prostorno-vremensko valno raspršenje. U posljednjih 20 godina postignut je napredak u boljem razumijevanju prostorne distribucije mirisnih valnih spojeva (Murlis i sur., 2000). Mirisi emitirani u zraku, raspršeni su kompleksno kao složene valne strukture (Murlis i sur., 1992). Raspršenje mirisa stvara gradijent koncentracije, koji se razlikuje u zavisnosti od udaljenosti od izvora (Jones, 1983) i ovisi o prevladavajućim uvjetima okoline kao što su temperatura i brzina vjetra (Murlis i sur., 1992).

Vremenske fluktuacije u aktivnoj emisiji. Vremenska emisija mirisa može se pokazati periodično u kratkom vremenskom intervalu (milisekundi) ili dužem periodu (sati ili dani). Miris se može pojaviti diskretno u kratkom vremenskom intervalu malog intenziteta; mirise takvog intenziteta emitiraju neke životinje prilikom obrane (prskanje sekreta tvorova ili mirisi kornjaša) te takvi mirisi traju samo nekoliko sekundi (Eisner i sur., 2001). S druge strane, emisija feromona kod nekih organizama može pratiti vremenski period koji korelira s dnevnim fazama (Foster, 2000; Kim i sur., 2002) ili s pojedinim razdobljima reproduktivnog ciklusa individua (Rekwot i sur., 2001; Swaisgood i sur., 2002). U situacijama gdje su vremenske fluktuacije konstantne, mogla bi se odrediti odstupanja u stopi emisije, kao funkcije vremenske frekvencije u ciklusima po vremenskom intervalu. Varijacija na takav dnevni ciklus emisije može se dogoditi kada se okolišni uvjeti promijene (Helsper i sur., 1998).

Kvalitativni i kvantitativni izvori mirisa. Osim prostorne i vremenske strukture emisije mirisa, značajno mjesto zauzimaju različiti izvori prirodnih mirisa, koji su sastavljeni od različitih hlapljivih spojeva, koji se nalaze u raznim izvorima mirisa (Raguso, 2003). Mirise stvaraju slični izvori (primjerice, cvijeće iste vrste) koji se mogu razlikovati u broju spojeva koji ih izgrađuju, tipu spojeva, kvantitativnom broju pojedinog spoja, te sveukupnog intenziteta mirisa (Raguso, 2003). Svaka pojedina nabrojana komponenta mirisa određuje kvalitetu samog mirisa, te na taj način direktno utječe na različito reagiranje životinja na njih i miris kao podražaj.

Kvalitativne varijacije mirisa. Većina kvalitativnih varijacija mirisa objašnjena je na cvjetnim mirisima. Cvjetni mirisi često su mješavine nekoliko spojeva. Knudsen i suradnici (1993) opisali su cvjetne mirise, koji se sastoje najmanje od tri, a najviše od nekoliko stotina spojeva. Varijacija u emisiji pojedinih hlapljivih spojeva, vjerojatno nastaje u različitoj genskoj ekspresiji enzima, koji proizvode hlapljivi spojevi i njihovi supstrati (Vainstein i sur., 2001). Kvalitativne inter-specifične razlike u stvaranju mirisnih spojeva općenito su veće nego intra-specifične razlike (Raguso, 2003). Proučavanjem intra-specifičnih razlika u cvjetnim mirisima uviđa se jasna razlika u sastavu mirisa. Varijabilnost je za svaku vrstu drukčija u sastavu mirisa, te biljke s više spojeva mirisa mogu imati veću varijabilnost tipova mirisnih spojeva kroz populaciju, čak i unutar jedne vrste, znatne varijacije postoje (Levin i sur., 2001).

Kvantitativne varijacije mirisa. Pod kvantitativnim varijacijama mirisa podrazumijeva se intenzitet mirisa, korelacija u koncentraciji mirisa, omjeri spojeva u koncentraciji mirisa i vremenske fluktuacije u mirisnim omjerima.

a). Intenzitet mirisa. Najvažniji aspekt mirisa je količina mirisa ili njegov intenzitet. Količina proizvedenog mirisa može varirati u zavisnosti od doba dana, okolišnim uvjetima i razvojnom stadiju organizma (Dudareva & Pichersky, 2000). Emitirani miris objekta sastoji se od individualnih mirisnih spojeva i ukupnog mirisnog intenziteta. Mirisni intenzitet definiran je kao suma koncentracija svakog pojedinog spoja. Razlike u intenzitetu mogu se pojaviti između pojedinih vrsta organizama. Intenzitet mirisa ne ovisi o broju prisutnih spojeva u mirisu; miris može imati nizak intenzitet ukoliko su svi spojevi zastupljeni u malim koncentracijama.

b). Korelacije u koncentraciji mirisa. Prirodni mirisi sastoje se od nekoliko različitih spojeva mirisa, gdje je svaka komponenta mirisa određena različitom koncentracijom. Koncentracija individualnih mirisa, razlikuje se od ostalih po veličini (magnitudi) koncentracije. Najbolje istražene koncentracije pojedinog mirisa objašnjene su na cvjetnim mirisima. U prosjeku, cvjetni mirisi u sebi sadrže 31 spoj koji ih definira (Anderson i sur., 2002). Prosječno je 17 (54%) spojeva prisutno u maloj koncentraciji, dok su ostali spojevi zastupljeni s manje od 1% u ukupnom mirisu. Svaka komponenta stvara 1-5% ukupnog mirisa, općenito 4 spoja stvaraju 5-20% mirisa, dok samo 2 spoja stvaraju više od 20% ukupnog mirisa.

c). Omjeri spojeva u koncentraciji mirisa. Omjeri u koncentracijama mirisa mogu biti korisni prilikom utvrđivanja sličnosti između različitih objekata koji emitiraju miris. U ovom slučaju omjeri pokazuju aktivnost biosintetičkih procesa prilikom stvaranja mirisa, a ne razliku u tlaku para prisutnih spojeva (Helsper i sur., 1998). Korelacije između koncentracija ukupnih spojeva i individualnog spoja odražavaju zajedničke biosintetičke procese (Degen i sur., 2004). Na primjer, spojevi nastali u istim enzimatskim procesima mogu se korelirati (Raguso i sur., 2003; Wright i sur., 2005), kao i spojevi nastali iz istog supstrata (Vainstein i sur., 2001). U velikoj količini supstrata, svaki pojedini spoj može biti zastupljen u velikom omjeru, s druge strane, manjom količinom supstrata, omjeri koncentracije mirisa opadaju. Omjeri koncentracija spojeva u mirisima moraju pokazivati veće inter-specifične varijacije od intra-specifičnih, što je karakteristika svih prirodnih mirisa. Udio stvorenog mirisa varira u određenom vremenskom intervalu, a može varirati i između objekata koji emitiraju mirise (Miklas i sur., 2000). Varijabilnost se može okarakterizirati, promjenom koeficijenta varijacije svakog spoja u mirisu, obzirom na uzorak cijele populacije objekta koji emitira miris (Wright i sur., 2005). Koeficijent varijacije može se definirati ako standardna devijacija izražena kao postotak srednjih vrijednosti (Sokal & Rohlf, 1995).

d). Vremenske fluktuacije u mirisnim omjerima. Vremenske fluktuacije u mirisnim omjerima nisu iste za sve spojeve koji variraju tijekom dnevne emisije. Pojedinačni spojevi nemaju isti koeficijent varijacije (Wright i sur., 2005). Razlikom u vremenskoj strukturi emitiranja pojedinih spojeva dolazi do promjene u omjerima koncentracija za svaki spoj, kao što postoji razlika u emitiranom mirisu iz različitog objekta. Tijekom dnevnog ciklusa, omjeri koncentracija spojeva dramatično variraju i ovise o vremenskom intervalu emitiranog mirisa.

2.3. Važnost mirisnih podražaja u životu komaraca

Mnoge studije pokazuju ovisnost osnovnih životnih navika komaraca (hranjenje, prikupljanje nektara i ovipozicija) o mirisnim podražajima (Nighorn & Hildebrand, 2002). Velika većina studija fokusirana je na atraktivnost ljudskog znoja i produkte ljudske kože na komarce (Bernier i sur., 2003; Qiu i sur., 2004). Spojevi emitirani iz domaćina poput karboksilnih masnih kiselina, mliječne kiseline, amonijaka, octenola i ugljičnog dioksida sada su poznati kao atraktivni spojevi za komarce (Dekker i sur., 2002; 2005; Merdić i sur., 2007; 2010; Jeličić Marinković i sur., 2014).

2.3.1. Traženje domaćina (host-seeking behavior)

Analize ljudske kože pokazale su da oko 300-400 spojeva mogu biti potencijalni atraktanti/repelenati za komarce (Bernier i sur., 2000.), među njima je oko 200 karboksilnih kiselina koje su značajne za život i elektrofiziološku aktivnost (Cork, 1996). Komarce privlače mješavine masnih kiselina s različitim duljinama lanaca od C4 do C18 (Knols i sur., 1997). Kod vrste *Ae. aegypti*, jaka privlačnost je utvrđena na kratkmi lancima masnih kiselina (C1-C3), nakon kojih slijede srednje dugi lanci (C5-C8) i dugi lanci (C13-C18), ukazuju na činjenicu kako su mirisni receptori ove vrste u stanju razlikovati duljine lanaca masnih kiselina (Bosch i sur., 2000). L-mliječna kiselina je jedna od karboksilnih kiselina koja je komponenta ljudske kože, ali se nalazi u ljudskom dahu (Bernier i sur., 2002). L-mliječna kiselina je slab atraktant za komarce kada se nalazi pojedinačno, ali u kombinaciji s amonijakom ili drugim produktima ljudskog organizma pokazuje značajna atraktivna svojstva na komarce (Bernier i sur., 2003). Još jedna važna komponenta je ugljični dioksid (CO2), za koga je poznato da sudjeluje u velikoj mjeri u cjelokupnom životu komaraca. Ugljični dioksid je komponenta daha kralježnjaka te je također i proizvod metabolizma kože. Iako je količina emitiranog CO2 iz kože vrlo niska u odnosu na izdahnuti CO2, kod komaraca je značajna pri manjim udaljenostima, kada komarac slijeće na domaćina radi hranjena (Gillies, 1980; Grant i sur.,, 1995). Komarci su u mogućnost detektirati promjenu koncentracije CO2 od 0,01% (Kellogg, 1970). Ugljični dioksid kao atraktant ne koriste sve vrste komaraca prilikom pronalaska domaćina. Općenito je poznato da ga više koriste komarci roda *Culex*. nego roda *Anopheles*. Jedan od najupečatljivijih učinaka CO2 je njegovo sinergističko djelovanje i povećana reakcija na druge podražaje; CO2 u kombinaciji s L-mliječnom kiselinom znatno povećava aktivnost komaraca prilikom polijetanja, lociranja domaćina i hranjena (Gillies, 1980; Eiras & Jepson, 1991).

2.3.2. Hranjenje polenom

Velikoj većini komaraca potrebna je energija iz šećernih izvora, koje pronalaze na cvijeću ili na nekim drugim izvorima cvjetnog nektara (Slika 1). Mužjacima kao i ženkama, energija dobivena iz polena osigurava potrebnu količinu energije za apetitivni let (Takken & Knols, 1999). Osim toga, ženkama su potrebni biljni ugljikohidrati za povećanje plodnosti i razvoj jaja (Nayar & Sauerman, 1975). Ishrana nektarom ovisi o dobu i veličini komaraca. Mlade i tek izlegnute ženke preferiraju uzimanja polena kao hrane u većoj količini, nego što to čine starije ženke, vjerojatno zbog niže razine lipidnog i glikogenog sadržaja kod mladih jedinki (Takken & Knols, 1999).

2.3.3. Ovipozicija

Kod većine vrsta ženki komaraca potreban je krvni obrok kako bi završile svoj reproduktivni ciklus, te kao takve su učinkoviti vektori. Izbor odgovarajućeg mjesta za ovipoziciju ima veliki utjecaj na preživljavanje ličinki, a time i na uspješnu proizvodnju nove generacije (Mokany & Shine, 2003). Mnoge vrste komaraca jako su izbirljive u izboru mjesta svoje ovipozicije, na način da iskorištavaju određene signale koje šalju potencijalna mjesta za ovipoziciju (Zahiri, 1997). Komarci su zbog savršeno razvijenih osjetila u mogućnosti pratiti kemijske signale koje emitiraju ovipozicijska mjesta. Ovipozicijski feromoni su kemijski signali koje proizvode specifične ličinke koje se nalaze na mjestima za ovipoziciju, osim njih dolazi do stvaranja osjetilnih signala od hlapljivih bakterijskih i gljivičnih metabolita, koji služe kao atraktanti za pogodna mjesta ovipozicije. Ženke imaju tendenciju polaganja jaja na mjestima gdje su nekada prije bile spomenute specifične ličinke koje stvaraju ovipozicijske feromone (Takken & Knolos, 1999). Mnoge kemikalije, kao što je fenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol (koji su produkti raspadnutih biljnih ostataka), 3-metilindol te 4-methilcikloheksanol, također su atraktivni spojevi specifičnih mjesta pogodnih za ovipoziciju komaraca (Millar i sur., 1992). Komarci najčešće odabiru mjesta za ovipoziciju, na kojima jedinke njihove vrste C:\Users\zeljka\Downloads\Slika 2 (1).tifveć sazrijevaju i koja ih koriste generacijama za ovipoziciju (Mokany & Shine 2003) (sl 1).

**Slika 1.** Fiziološka i senzorna osnova života komaraca. Reproduktivni, seksualni, prehrambeni i razvojni ciklusi uključeni u život komaraca pod utjecajem su vanjskih podražaja, koji su kombinacija osjetilnih modaliteta. Preuzeto s : www. vandrebilt.edu

2.4. Osjetilni sustav komaraca

2.4.1 Periferni osjetilni sustav komaraca

U svijetu kukaca, periferni osjetilni sustav nalaze se kao parni organi na glavi, nazvani antene (sl. 2A) Osim njih, mnogi kukci imaju dodatne mirisne organe koji mogu biti smješteni na usnim organima, npr. labijalnoj palpi kod leptira (Lepidoptera) te niz mirisnih osjetila smješteni na gornjim palpama kod dvokrilaca (Diptera) (Keil, 1999). Antena kao osjetilni organ komaraca sastoji se od 13 segmenta spojenih na bazu, koja izgleda kao okrugla peteljka, koja na sebi ima Johnstonov organ (JO). Johnstonov organ je osjetilni aparat koji funkcionira kao organ sluha, a sastoji se od nekoliko tisuća radijalno postavljenih mehanoreceptora (7500 ženke, 15000 mužjaci) poznatih kao skolopidiji (Clements, 1999).

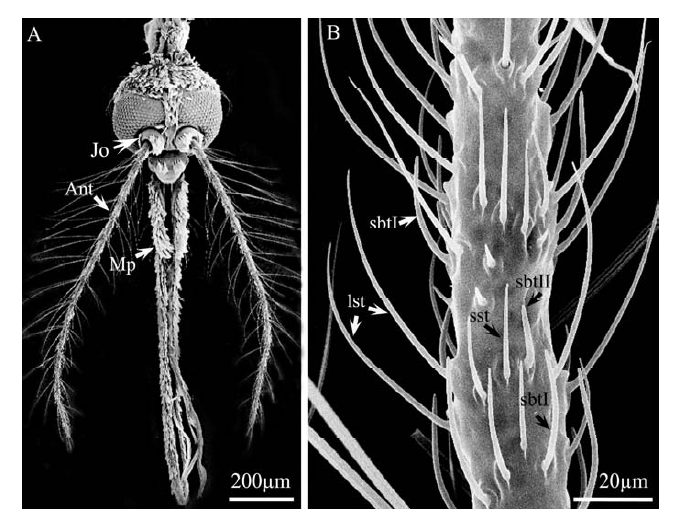
U morfologiji antena komaraca uočava se spolni dimorfizam. Kod mužjaka, sve vrste mirisnih osjetila nalaze se većinom na samo dva segmenta i orijentirani su distalno, dok su kod ženki relativno ravnomjerno raspoređena mirisna osjetila duž flagelarnih segmenata (Pitts & Zwiebel, 2006). Ticala ženki komaraca su dužine oko 1,5 mm, s dužinom pojedinog segmenta u rasponu od 90 µm do 160 µm. Antene mužjaka su duže, oko 2,2 mm, a posljednja dva terminala segmenata blago su povećana (između 380 µm i 200 µm) (Van den Broek, 2000).

Antenalne sensile komaraca. Površina antena kod komaraca, kao i kod većine kukaca, prekrivena je mnogim kutikularnim dlačicama nazvanim sensilama. Sensila je najmanja funkcionalna osjetilna struktura u osjetilnom sustavu kukaca (Keil, 1999). Sve osjetilne sensile imaju istu morfologiju, koju izgrađuje između 1-5 bipolarnih osjetilnih receptornih neurona (ORN) (sl. 3A). U osjetilnim limfnim šupljinama nalaze se dendriti ORN (tijelo ORN-a). Tijelo ORN nalazi se neposredno ispod osjetilne baze, a njihovi aksoni šalju informacije putem antenalnog živca do antenalnog režnja koji su međusobno povezani. Ostale komponente sensile su pomoćne bazne stanice, koje uključuju thecogen, tormogen i trichogen stanice (sl. 3A). Bazne stanice uključene su u stvaranje sensila tijekom ontogeneze, kao i u regulaciju ionskog sastava sensilarne limfe (Keil, 1999). Trichogen i tormogen stanice imaju sekretorne funkcije, pretpostavlja se da su odgovorni za sekreciju mirisnog vezujućeg proteina (OPB) (Steinbrecht, 1998). Epidermalna površina sensile prilagođena je propuštanju molekula mirisa iz okoline do osjetilne limfe (sl. 3A) (Keil, 1999). S obzirom na debljinu stjenke sensila razlikuju se dvije vrste mirisnih sensila; jednoslojne i dvoslojne sensile. Kod jednoslojnih sensila pore su spojene limfom uz pomoć pornog kanala. Unutarnja površina kanala pokrivena je lipidnim slojem koji omogućava prijenos molekula mirisa u limfu. Kod dvoslojnih sensila takvi kanali ne postoje. Umjesto toga, epidermalne strukture sensila sastoje se od povremeno invaginirane površine, koja poprima šiljastu strukturu. Kanali izrađeni između spojenih šiljastih struktura nazivaju se „komunikacijski kanali“, čija je funkcija propuštanje molekula mirisa iz okoline do limfe (Keil, 1999).

Sensile su odgovorne za otkrivanje mirisnih podražaja. Procjenjuje se da 90% antenalnih osjetilnih neurona kod ženki i mužjaka, imaju mirisnu funkciju (McIver, 1982). Osim toga, mehano, hidro i termo osjetilni neuroni smješteni su unutar sensilarnog niza (McIver, 1982). Antenalne sensile razlikuju se na temelju morfoloških karakteristika, različitoj neuronskoj inervaciji i funkciji neurona. Poznato je pet morfološki različitih vrsta sensila: sensilla chaetica, s. ampullacea, s. coeloconica, s. trichodea i grooved peg sensilla (klinasta užlijebljena) (Pitts & Zwiebel, 2006). Prve tri nabrojane sensilarne vrste inerviraju se mehano, termo ili hidro receptornim stanicama (McIver, 1982). Sensilla trichodea i užlijebljena klinasta sensila, čine 90% ukupnog antenalnog sensilarnog sustava (McIver, 1982). Ove sensile imaju 2 ili 3 mirisna receptorna neurona (McIver, 1978). Svaka antena ženke vrste *Ae. aegypti* i *An. gambiae* posjeduju oko 900-1000 sensila od kojih oko 2.000 receptornih stanica šire svoje aksone u mozgu (Pitts & Zwiebel, 2006).

a). Sensila trichodea komarca. Sensila trichodea (sl. 2B) čine dvije trećine svih sensila, te je stoga najzastupljenija vrsta osjetilne strukture na flagelarnim antenama komaraca (Pitts & Zwiebel, 2006). Procjenjuje se da je broj ovih sensila kod ženki vrsta *An. gambiae* i *Ae. aegypti* između 650 i 800 na svakoj anteni (Pitts & Zwiebel, 2006). Ova vrsta sensila prisutna je na svim flageralnim segmentima kod ženki, dok se kod mužjaka nalazi na dva terminalana segmenta (Boo, 1980a, b). Međutim, kod ženki, trichodea su rijetke na prvom segmentu, a njihova najveća gustoća je između 4 i 13 segmenta (Van den Broek, 2000).

Na temelju dužina, oblika i debljina stijenke, razlikuju se četiri morfološka podtipa trichodea sensile: kratka oštrog vrha (sst), duga oštrog vrha (lst), kratka tupog vrha tipa I (sbtI) i kratka tupog vrha tipa II (sbt II) (sl. 2B). Postoje, međutim, brojni podtipovi koji se ne uklapaju ni u jednu od nabrojana četiri podtipa (Davis & Rebert, 1972). Ultra struktura jasno dokazuje da se svi podtipovi inerviraju uz pomoć dva neurona, osim u slučaju podtipa sensile kratka oštrog vrha koji posjeduje samo jedan receptorni neuron (McIver, 1978). Istraživanja Van den Broek (2000) jasno pokazuju osnovnu kemo osjetilnu funkciju sensilarnih trichodea. One su osnovni mirisni osjetilni organi koji prepoznaju miris domaćina i osiguravaju komarcima najbolje informacije o okolini u kojoj se nalaze.



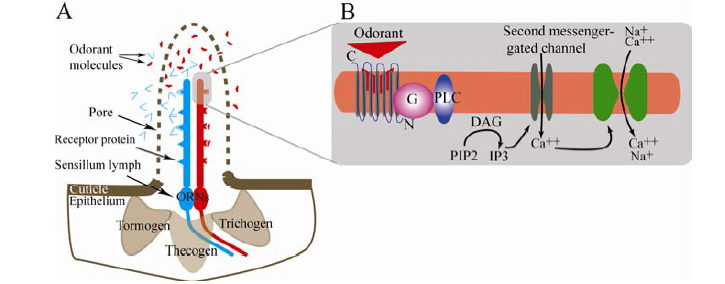
**Slika 2. (A)**. Elektronska mikrofotografija olfaktornih organa, antena, maksilarnih palpi i Johnstonov organ (JO) **(B)**. Individualni segment antene vrste *Aedes aegypti* koji prikazuje podtipove sensila: kratka- oštrog vrha (sst), duga-oštrog vrha (lst), kratka- tupog vrha tipa I (sbtI) i kratka- tupog vrha tipa II (sbt II) (Ghaninia i sur., 2007)

2.4.2. Funkcije perifernog sustava u mirisnoj recepciji

Transport molekula mirisa kroz senisilarnu limfu. Molekule mirisa emitirane od strane domaćina razrijeđene su u okolišu. Osjetilni sustav kukaca u mogućnosti je prepoznati mirise koji su prošli kroz kutikularnu poru i na kraju stigli do mirisnih receptora (sl. 3B). Molekule mirisa su većinom nepolarni hlapljivi spojevi koji posjeduju dobru orijentaciju prilikom prolaska kroz sensilarnu limfu do mirisnih receptora koji se nalaze na membrani ORN-a. Proteini koji na sebe mogu vezati molekule mirisa, nazvani su mirisni vezujući proteini ili OBP (Vogt & Riddiford, 1981)). Potporne stanice sintetiziraju OBP i izlučuju ih u senislarnu limfu (Blomquist & Vogt, 2003). Godine 1985 (Vogt i sur., 1985), opisan je mehanizam prijenosa mirisnih molekula uz pomoć OBP do osjetilnih receptora na ORN. Prema toj teoriji, molekule mirisa, koje su jednom ušle u senislarnu limfu, prepoznaje ih OBP koji ih veže na sebe i nosi do ORN. Važno je napomenuti kako OBP nisu odgovorni samo za detekciju i transport molekula mirisa kroz limfu, nego su uključeni i u interakciju između molekula mirisa s receptornim proteinima, na način da razgrađuju molekule mirisa, koji se nalaze vezane za receptor proteina, kako bi osigurali slobodno mjesto na receptoru, da bi se na njega mogla vezati nova molekula mirisa. Podrobnije uloge OBP još uvijek su nedovoljno istražene.

Mirisni receptorni proteini (OR). Mirisni receptorni proteini kodirani su velikom raznolikošću gena, više gena (500-1000) ima širi raspon prilikom prepoznavanja mirisa za razliku od onih OR koji imaju manji broj gena (30-100) gdje je percepcija u rasponu niža. Poznato je da svaki funkcionalni tip ORN izražava samo jedan receptorni protein (Elmore i sur., 2003). Međutim i za ovu hipotezu postoje iznimke koje su dobro objašnjene na primjeru *Drosophila* sp. (Fishilevich & Vosshall, 2005; Goldman i sur., 2005), te se primjenjuju i kod vrsta komaraca *An. gambiae* i *Ae. aegypti*, kod kojih je otkriveno 79 mirisnih receptornih osjetilnih gena za vrstu *An. gambiae* i 131 za *Ae. aegypti* (Bohbot i sur., 2007). Međutim, na svakom antenalnom režnju nalazi se 50-60 glomerula, svaki glomerul je pod nadzorom ORN-a kojeg izražava pojedinačni receptorni gen. U ovakvoj situaciji, značilo bi da neki OR geni moraju biti pseudogeni ili s druge strane, neki ORN moraju biti izraženi s više od jednog tipa OR. Ovakav način multireceptorne ekspresije u ORN pruža dodatnu mogućnost kodiranja mirisnih informacija u periferni sustav (Goldman i sur., 2005), te je na taj način funkcija ORN proširena na širi spektar mirisnih spojeva.

Mirisni transdukcijski (prijenosni) mehanizam. Mirisni transdukcijski mehanizam posredovan je transdukcijskim proteinima, kao što su OBP, ORS zadrživačima (koji posreduju prilikom zatvaranja transdukcijskog puta), G-proteinima i enzimima (sl. 3B) (Benton i sur., 2006). Transdukcijski signali pojačavaju ulazni signal, te na taj način uzrokuju promjene u receptornom potencijalu, što može rezultirati inhibiciju ili pobuđivanje ORN (Zwiebel & Takken, 2004). Uzbuđenje ili inhibicija ORN-a predstavlja prvi diskriminacijski korak prilikom detektiranja i reagiranja na mirisne podražaje (Hallem i sur., 2006). G-proteinski vezujući receptori (GPCR) predstavljaju ključne dijelove osjetilnih puteva (Zwiebel & Takken, 2004). Općenito, vezanje mirisnih liganada na mirisne receptore dovodi do aktivacije vezujućih G-proteina, koji potom aktiviraju kaskadu signala (slika 3B) (Hildebrand & Shepherd, 1997). Kod kukaca, aktivacija GPCR dovodi do stvaranja fosfolipaze C i na kraju do proizvodnje drugog glasnika, IP3 (glavni put prijenosa kod kukaca) i/ili cAMP (sl. 3B) (Hildebrand & Shepherd, 1997). Ukoliko dolazi do aktivacije drugog glasnika, rezultat će biti otvaranje ili zatvaranje ionskih membranskih kanala, što dovodi do depolarizacije ili hiperpolarizacije dendritne membrane (Slika 3B). Receptorni potencijal kreće se duž dendrita do inicijalnog mjesta i ukoliko dosegne prag akcijskoj potencijala, akcijski potencijal će biti izazvan. Putovanje akcijskog potencijala od aksona ORN do antenalnog režnja, dovodi do prijenosa informacije o kvaliteti, količini i prostorno-vremenskim obrascima mirisa (Nighorn & Hildebrand, 2002).



**Slika 3**. (A). Shematski prikaz osjetilne sensile i njezinih funkcionalnih dijelova, koji se sastoji od porozne epidermijske pore, mirisni receptor neurona (ORN), tri tipa pomoćnih stanica (trichogen, tormogen i thecogen); **(B).** Nakon vezivanja molekule mirisa na mirisni receptor, započinje generacija fosfolipaze C (PLC). PLC pretvara fosfatidilinozitol 4,5-biphosphate (PIP2) na drugi glasnik IP3 (inozitol 1,4,5 trifosfat) i diacilglicerol (DAG). IP3 utječe na otvaranje ili zatvaranje membranskih ionskih kanala (Ca + + i Na +) te dovodi do depolarizacije ili hiperpolarizacije na dendritu (Buck & Axel, 1991).

Kodiranje mirisa. Kukci su u stanju detektirati tisuće mirisa u njihovom okruženju (Hildebrand & Shepherd, 1997). Iako je diskriminacija i integracija mirisa i mješavine mirisa funkcija koja se događa u središnjem živčanom sustavu (SŽS) kukaca, periferni osjetilni receptorni neuroni (ORN) imaju glavnu ulogu u otkrivanju, identificiranju i diskriminiranju mirisnih molekula, te potrebne informacije prosljeđuju SŽS. Kako bi se razumjelo kodiranje mirisa kod kukaca, bitno je identificirati pojedine ORN i njihovu klasifikaciju, kroz njihovu aktivaciju prema specifičnim mirisima (Malnic i sur., 1999). Različite dijelove antenalnog režnja pobuđuju ORN, periferni mirisni kod pretvara se u glomerulima, odakle se mirisna poruka prenosi do viših moždinskih centara za asimilaciju, što u konačnici dovodi do reakcije prilikom mirisnog podražaja u slučaju kada je dovoljna količina mirisa primljena.

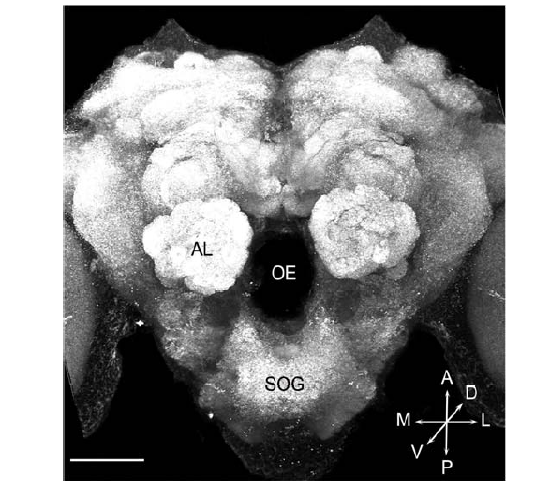
Poznate su dvije teorije o kodiranju mirisa. Prva teorija sugerira da ligand aktivira samo određenu vrstu receptornih stanica i od tamo se podatci prenose izravno na antenalni režanj, odakle se šalje višim moždinskim centrima bez prethodnih modeliranja ili vezivanja ulaznih signala. Ovakvo mirisno kodiranje nazvano je linijsko, u kojem jedna mirisna molekula aktivira jedan glomerul (Hansson & Christensen, 1999). Prema drugoj teoriji, veliki broj ORN-a uključeno je u detektiranje određenih mirisa, te je aktivno više od jednog glomerula. Na taj način diskriminacija između dva mirisa je olakšana na središnjoj razini (Hansson & Christensen, 1999).

Niti jedna od navedenih teorija u potpunosti ne odgovara kodiranju mirisa kod kukaca. Umjesto toga, Malnic i suradnici (1999) postavljaju hipotezu koju nazivaju kombinirano kodiranje mirisa kod kukaca. Prema toj hipotezi, različiti ORN izraženi su različitim receptornim proteinima, koji su široko sinkronizirani na skupinu spojeva s različitim afinitetima. Karakteristike mirisnih molekula kao što su oblik, različita distribucija i hidrofobnost funkcionalnih skupina, može utjecati na njihov afinitet (Ignell & Hansson, 2005). Na taj način, ORN stvara različit profil odgovora na različite spojeve koji ga podražuju. Osim toga, miris može aktivirati nekoliko ORN s različitim afinitetima (Hallem & Carlson, 2006). Jednim mirisnim podražajem dolazi do aktivacije osnovnog glomerula koji se nalazi u mreži manje aktivnih glomerula. Povećanjem koncentracije mirisa, dolazi do povećanja broja aktivnih glomerula iz mreže (Galizia & Menzel, 2001).

2.4.3. Središnji mirisni sustav

O središnjem mirisnom sustavu kukaca manje se zna nego o bilo kojem drugom sustavu. Jedan od razloga takvog nepoznavanja može se potražiti u složenosti mirisnog sustava kod kukaca. S druge strane, općenito se vjeruje da miris ima širi utjecaj na ponašanje kukaca nego bilo koji drugi senzorni modalitet.

Primarni mirisni centar (antenalni režanj). Antenalni režnjevi (AL) kukaca, dvije su ispupčene sferične neuropile koje se nalaze s obje strane jednjaka (sl. 4) (Anton & Homberg, 1999). Unutar AL nalaze se kuglaste strukture nazvani glomeruli. U antenalnim režnjevima nalaze se primarni mirisni procesni centri kukaca. Glomeruli su obično raspoređeni u jednom ili dva sloja oko središnje jezgre (srži) vlakna. Općenito su odvojeni jedni od drugih glija stanicama (Ignell i sur., 2005). Broj, oblik, veličina i druge karakteristike glomerula su specifične kod nekih vrsta.



**Slika 4.** Antenalni režnjevi (AL) ženke *Anopheles gambiae* (Ghaninia i sur., 2007).

2.5. Izvori i karakteristike mirisa domaćina

Komarci imaju sposobnost orijentacije prema različitim mirisnim podražajima kojeg domaćini emitiraju. Neki od podražaja su kemijski, sastavljeni od organskih i anorganskih komponenata, dok su drugi fizikalni. Individualni podražaji, mogu biti kratkotrajni ili dugotrajni, te pobuđivati osjetila komaraca, i na taj način davati informacije komarcima o lokaciji potencijalnog domaćina. Radi boljeg razumijevanja suodnosa između komaraca i domaćina, potrebno je što bolje poznavanje i determiniranje izvora mirisa domaćina.

2.5.1. Kemijski podražaji

Spojevi koji su u mogućnosti pobuđivati prijemnike ponašanja ili fiziološki odgovor nazivaju se kariomoni. Kariomoni su drugim riječima, spojevi domaćina koji daju pozitivan odgovor komaraca prilikom mirisnog podražaja. Mnogi od njih su u maloj mjeri hlapljivi i djeluju pri vrlo malim udaljenostima, što je slučaj prilikom slijetanja. Međutim, kralježnjaci proizvode veliku količinu hlapljivih spojeva, koji djeluju pri velikim udaljenostima.

Izvori kemijskih podražaja. Izvori kemijskih podražaja uključuju: izdahnuti dah, organe ili kožu kroz koju se difuzijom emitira miris, epidermalu sekreciju i njihove bakterijski raspadnute produkte, flatus, urinarne i fekalne kontaminante i njihove bakterijske raspadnute produkte. Ranija istraživanja pokazuju kako komarci reagiraju na ljudski dah, znoj i urin.

a). Dah. Utvrđena su dva izvora izdahnutog daha. Velika većina izdahnutog zraka dolazi iz plućnih alveola, a ostatak dolazi iz zraka koji ispunjava respiratorne odjeljke u svakom dahu (tkz. mrtvi prostorni zrak). Kemijski sastav „završnog respiratornog zraka“ reflektira se doprinosom dvije gore navedene komponente. Količina bilo kojeg sastavnog dijela daha koji je individualno ispušten, funkcija je koncentracija krajnjeg respiratornog zraka i volumena zraka koji je izdahnut (tidalni volumen). Kod mlađih muškaraca tidalni volumen iznosi oko 500 ml, koji obuhvaća 350 ml alveolarnog zraka i 150 ml praznog prostora. Normalni respriratorni udio je otprilike 12 udaha po minuti, iz čeka proizlazi da je respiratorni minutni volumen otprilike 6 l/min (Guyton, 1977). Izdahnuti zrak je glavni izvor dvaju kariomona kod hematofagnih Diptera, a to su CO2 i vodena para, koji predstavljaju njegov veliki kvantitet. Hlapljive organske komponente koje se nalaze u krvi transportirat će se kroz dah u okolinu. Dva ketona: aceton i butanon, akumuliraju se u krvi goveda nakon hranjenja, nizom metaboličkih procesa dolaze u dah putem kojeg će se emitirati kao mirisni podražaji domaćina.

b). Koža. Difuzijom kroz unutrašnji sloj kože dolazi do stvaranja jedne komponente kemijskog podražaja, CO2, kao malog izvora s obzirom na cjelokupnu CO2 emisiju. Na isti način dolazi do gubitka male količine vode iz organizma, kada se kapilarna voda difuzijom prenosi do površine kože. Evaporacija takve vode naziva se „neosjetljiva perspiracija“. Međutim, velika većina spojeva koja se emitira iz kože posljedica je žljezdane aktivnosti. U koži se nalaze tri vrste žlijezda: endokrine, egzokrine i lojne žlijezde. Znoj je sekret endokrinih i apokrinih žlijezda. Endokrine žlijezde zastupljene su u svim sisavcima, iako je njihov raspored ograničen. To su žlijezde koje su najbolje razvijene kod ljudi, i nalaze se u velikom broju na tabanima, obrazima, čelu, podlaktici i pazuhu. Kao osnovne sekrete imaju natrij klorid, laktat, ureu i druge osmotski aktivne spojeve, koji stvaraju osmotski gradijent i ekstrakte vode iz seroznih stanica. Endokrini znoj u većini slučajeva je voda. Egzokrine žlijezde općenito se nalaze u pazuhu, na licu i tjemenu, te na perigenitalnom i perianalnim dijelovima kod čovjeka, ali nisu jednako razvijene kod svih ljudski rasa. Sekreti egzokrinih žlijezda kod ljudi sadrže proteine, karbohidrate i amonijak; voda je zastupljena u neznatnim količinama. Egzokrine žlijzde stimulirane su hormonom adrenalinom. Većina sisavaca (konji, deve, goveda, ovce i koze) ima raspoređene egzokrine žlijezde po cijeloj površini tijela te toplinski stres kod njih uzrokuje znojenje cijele površine tijela. Karakteristično je da ptice nemaju ni jedan oblik znojnih žlijezda. Svježi sekreti egzokrinih znojnih žlijezda kod ljudi su bezmirisni, miris kao takav uzrokuju aerobne bakterije nakon 6 sati inkubacije. Kod ljudi, lojne žlijezde zastupljene su u većoj mjeri na cijeloj površini ljudskog organizma. Brojna istraživanja su pokazala kako komarci pozitivno reagiraju na ljudski znoj. Značajna većina ženki roda *Aedes* reagira bolje na čarape koje su natopljene znojem, nego na oznojenu odjeću (Browen, 1951). Mirisna osjetila kod komaraca drugačija su nego kod ljudi; prilikom prepoznavanja određene koncentracije CO2 i mliječne kiseline,kao hlapljivih znojnih komponenti. Količina hlapljive komponente kože uvjetovana je brojnim faktorima; njihovim ionskim stanjem, topljivost površinskih lipida itd.

c). Urin. Urin kao kariomon u većini slučajeva istraživao se na muhama, ali u obliku fenola. Svjež produkt bizonova urina sadrži vrlo malu koncentraciju fenola, dok urin koji je čuvan na sobnoj temperaturi nekoliko dana sadrži veliku količinu spojeva, koji su nastali hidrolitičkim aktivnostima bakterije *Aerococcus viridans* (Okech & Hassanali, 1990).

Komponente daha i sekreti površine kože. Velika većina spojeva i hlapljivih komponenti nalaze se na površini kože životinja, ali su samo neke od njih kariomoni za hematofagne Diptere. Neke od njih zastupljene su u velikim koncentracijama, dok se neke nalaze samo u tragovima. Bitno je naglasiti, kako je osjetljivost praga podražaja u osjetilnim organima kod ljudi i komaraca različit, s obzirom na pojedinačne spojeve, te se može čak razlikovati i između različitih vrsta komaraca.

a). Vodena para. Evaporacija vode iz tijela stvara se pri znatnim udjelima iz daha kroz „neosjetljivu perspiraciju“, difuzijom vode direktno kroz *stratum corneum* i sekrecijom endokrinih i egzokrinih znojnih žlijezda. Alveolarni zrak izdahnut iz kralježnjaka uvijek je zasićen vodenom parom. Udio gubljenja vode iz organizma muškarca je između 0,04-0,56 mg cm-1h-1. Pod različitim stupnjevima stresa, količina ljudskog znoja varira između 0,25-1,5 mg cm-1h-1. Općenito, kod muškaraca više nego kod žena, količina znoja veća je tijekom noći nego tijekom dana. Količina vodene para koja je izdahnuta otprilike je između 16 i 18 ml/h (Jarrett, 1978). Evaporacija vode kroz kožu kod konja, kamila, goveda, ovaca i koza varira s obzirom na utjecaj egzokrinih žlijezda i neosjetljivu perspiraciju, te ima vrijednost oko 320gm-2h-1. Vrijednost gubljenja vode iz tijela kod ptica ovisna je o tjelesnoj i okolišnoj temperaturi te može biti između 0,9 i 2,1 mg/ml.

b). Ugljični dioksid. Ugljični dioksid nalazi se konstantno u zraku, njegova koncentracija nadopunjava se truljenjem biljaka te biljnom i životinjskom respiracijom. Tijekom sunčevog svijetla kada biljke vrše fotosintezu dolazi do uklanjanja CO2 iz okoline te samim tim i do fluktuacije u okolišnoj koncentraciji. Koncentracija CO2 u zraku pri zemlji iznosi od 0,02 do 0,06 vol%. Korištenjem osjetilnih detektora za CO2, moguće je uočiti kratkotrajnu promjenu u koncentraciji CO2 koja se razlikuje između različitih tipova staništa. Osim u različitim tipovima staništa, uočava se i različita fluktuacija u koncentraciji CO2 na dnevnoj razini, koja iznosi u 5 h 356 ppm, a povećava se tijekom dana i u 16 h iznosi 364ppm. Između 19 i 20h povećava se neznatno, ali između ponoći i 3h ujutro ima najveću vrijednost koja iznosi 400 ppm, da bi se vrijednost nakon toga, smanjila do 5h ujutro, na već spomenutu koncentraciju. Općenito, uočava se promjena u fluktuaciji, mjerenoj na 5min skali, od ±1 ppm tijekom dana (Meixner, 1994). Količina CO2 koja se otpušta iz tijela životinje varira s obzirom na njihovo metaboličko stanje. Pojedini dijelovi tijela kod čovjeka (ruka, pazuh, koža) emitiraju različitu količinu CO2 koja može varirati od 3.4x10-5 ml cm-2min-1 do 4.6x10-5 ml cm-2min-1 (Frame i sur., 1972).

c). Organske komponente daha. U ljudskom dahu određene su 102 organske komponente, od kojih 97%, ima ukupni udio u dahu između 0,06 i 9,5 ng/l. Tri organske komponente daha zastupljene su u 51% udjelu, to su aceton s 120 ng/l, isopren s 33 ng/l i acetonitril s 24 ng/l. Varijabilnost u koncentraciji za 92% komponenti, je individualna i iznosi manje od jedne vrijednosti magnitude (Krotoszynski i sur., 1977). Ketoni acetona i butanona su prisutni, ali nisu varijabilni, u dahu domaćih goveda; udio acetona iznosi 0,9 mg po govedu na sat, dok je vrijednost za butanon manja i iznosi 0,19 mg/h. Vrijednosti acetona i butanona različite su između daha goveda i emitiranih komponenti iz tijela pogotovo za aceton koji ima znatno veću vrijednost kada se emitira iz kože (7mg/h) nego iz daha (0,9mg/h) dok je kod butanona ta vrijednost podjednaka (Torr i sur., 1995). Aceton predstavlja važan kariomon za hematofagne Diptere.

d). Mliječna kiselina. Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropionska kiselina, CH3CH(OH)COOH, nalazi se u krvi i mnogim tkivima. Laktat se stvara u anaerobnoj glikolizi, kao dio mehanizma prilikom stvaranja znoja. Mliječna kiselina se iz tog razloga nalazi u ljuskom znoju u velikoj količini za razliku od drugih karboksilnih kiselina. Koncentracija mliječne kiseline iz ljudskog znoja varira između 1000 i 5100 µg/ml (Cork & Park, 1996). Vrijednost hlapljive mliječne kiseline iz ljudske ruke je između 30 do 80 µg/h. Repelentni učinak mliječne kiseline na komarce vrste *Ae. aegypti* uvjetovan je određenom količinom emitirane mliječne kiseline i 600 µg mliječne kiseline ima značajno manji utjecaj nego koncentracija od 50 µg (Smith i sur., 1970). Vrsta *Ae. aegypti* reagira manje učinkovito na mliječnu kiselinu iz ljudskog daha nego na emitiranu količinu iz ljudskih ruku. Jedan od razloga može se potražiti u neadekvatnom stimulansu osjetilnih neurona za mliječnu kiselinu u antenalnim sensilama (Davis & Sokolove, 1976).

e). Octenol. Octenol je sekundarni derivat alkohola 1-octen, dužeg naziva 1-octen-3-ol, te formule CH3(CH2)CHOHCH2=CH2 (C8H16O), poznat kao jedan od važnih kariomona u životu hematofagnih Diptera. U prirodi je zastupljen u dvije optičke enantiomere: (*R*)-(–)-1-octen-3-ol i (*S*)-(+)-1-octen-3-ol. 1-octen-3-ol češće zvan octenol, sastavni je dio daha preživača. U klopkama, dvije predstavljene enantiomere octenola jednake su učinkovitosti prilikom uzorkovanja hematofagnih Diptera. Kumulativno određena količina octenola u zraku koja je emitirana iz goveda iznosi 0,043 mg po govedu po satu. Udio emitiranog octenola je znatno manji od udjela acetona kao kariomona za kukce. Udio emitiranog acetona iz preživača iznosi između 1 i 24 mg po govedu po satu što je značajno veća vrijednost nego kod octenola. Octenol je zastupljen u malim koncentracijama u ljudskom znoju, ali bez obzira na njegovu malu zastupljenost pobuđuje antenalne receptore komaraca (Cork & Park, 1996). Osjetilni neuroni za octenol smješteni su u jednoslojnim klinastim sensilama na maksilarnim palpima komaraca.

f). Ostale komponente. Oko 300 do 400 sastojaka produkata metabolizma emitiraju se iz ljudskog tijela, od kojih se oko 100 nalazi u ljudskom dahu. Produkte metabolizma čine razni alkoholi, ketoni, amini, acidi, esteri i aldehidi; sulfhidrili, ciano i heterociklične komponente, te mnogi zasićeni i nezasićeni hidrokarboni (Ellin i sur., 1974). Velika većina istraživanja pokazuje postojanje učinkovitosti navedenih komponenti na atraktivnost komaraca. Aminokiseline općenito se ne smatraju hlapljivim komponentama, ali su kod komaraca uočeni različiti odgovori u ponašanju prilikom podražaja hlapljenja nekih aminokiselina (Clements, 1999). Interesantno je da hlapljenjem alanina (2-aminopropanska kiselina), koji je analog mliječne kiseline, stimulira antenalne receptore za mliječnu kiselinu. Mirisi ljudskog urina, muškaraca ili žena, pobuđuju osjetila komaraca. Značajan odgovor u ponašanju komaraca dobiven je proučavanjem mješavine fenola i 5 alkilnih derivata (3- i 4-metil, 3- i 4- etil i 2-propilfenola) u usporedbi s klopkama u kojima se nalazio CO2, u korist mješavine. Neki steroidi i seksualni feromoni nalaze se u znoju i urinu kod ljudi (Claus i sur., 1981).

2.5.2. Raspršenje mirisa

Miris se emitira iz točkastog izvora, odakle se fragmenti i oblici valovitih i vijugavih tragova filamenata mirisa nose zrakom uz vjetar. Raspršenje mirisa povećava se udaljenošću od izvora mirisa. Kada se feromoni i kariomoni nose vjetrom, od biološkog je značenja da se dobro distribuiraju u okolišu, kako bi došle do osjetilnih nosača mirisa, koji će ih usmjeriti prema njihovom cilju.

Utjecaj vjetra i vegetacije. Miris koji je ispušten u vjetar ulazi u zračnu struju, kroz turbulenciju, dolazi do njegove različite gustoće u zraku te može varirati u različitim smjerovima. Miris se kroz zrak brzo raspršuje i stvaraju se snopovi mirisnih filamenata tijekom turbulencije mirisa. Snopovi filamenata i filamenti sa snopovima mirisa odvojeni su međusobno čistim zrakom. Snopovi tijekom raspršenja pomjeraju se dalje od izvora samog mirisa, te na taj način uvjetuju turbulenciju zraka. Mirisni filamenti mogu se transportirati valovito nekoliko metara prije nego budu zarobljeni s čistim zrakom prilikom male turbulencije (Clements, 1999). Kukci s dobro razvijenim osjetnim organima mogu detektirati snopove filamenata mirisa, kao raspršen miris, koji variraju u koncentraciji i postojanosti.

Smjer, oblik i struktura raspršenog mirisa regulirana je različitim veličinama vrtloga u zraku. Vrtlozi iste ili veće veličine u raspršenju, imaju utjecaja na smjer raspršenja u potpunosti. Vrtlozi manjeg intenziteta uzrokuju različite varijacije tijekom raspršenja. Kurs i oblik raspršenja, određeni su vjetrom, odnosno varijacijom njegove brzine i smjera. Općenito, brži vjetar uzrokuje ravnomjernije raspršenje mirisa od izvora, dok je za neka raspršenja manja brzina vjetra odgovorna za bolje razrjeđenje mirisa, te se na taj način miris širi kroz veći volumen pasivnog zraka. Promjene u strukturi raspršenja i njegova detekcija komplicirana je posredstvom bioloških parametara koji su teško mjerljivi, kao što je učinkovitost brzine vjetra na količinu raspršenog mirisa i učinkovitost mirisnih receptora. Za ponašanje komaraca prilikom prepoznavanja mirisa najvažnija je trenutna koncentracija mirisnih snopova u filamentima, a ne srednja vrijednost koncentracije raspršenog mirisa (Elkinton i sur., 1984).

Turbulencija je dio vjetra uvjetovana i vegetacijom, tako da različiti tipovi staništa imaju utjecaja na različite karakteristike raspršenja. Brzina vjetra eksponencijalno usporava između visine drveća i površinskog sloja. Ukoliko je brzina vjetra iznad visine drveća između 1 i 3 m/s, onda je brzina vjetra, 1 m iznad površine zemlje, između 0,2 i 0,5 m/s (Clements, 1999). Brzina vjetra koje imaju male dosege događaju se tijekom cijelog dana u šumovitim predjelima, ali mogu biti zabilježene u otvorenim staništima tijekom kratkog periodna nakon zore (svitanja), prije nego što solarno zagrijavanje zemljine površine dovede do većih pokretanja u zraku. U vrlo rijetkim slučajevima kada ne dolazi do promjene u smjeru vjetra, tada se miris raspršuje linijski. Važno je napomenuti, kako je vrlo kratak period dana kada ne dolazi do promjene u smjeru vjetra i kada je dugačka os raspršenja mirisa, tada je vjerojatnost da se kukci orijentiraju do izvora mirisa uz vjetar i usmjeravaju se prema izvoru raspršenja, jako mala.

Emitiranje raspršenog mirisa od domaćina. Temperatura i vlažnost raspršenog mirisa ostaju raspršeni samo u neposrednoj blizini domaćina, dok CO2 i neke organske spojeve komarci prepoznaju na velikim udaljenostima od domaćina. Udaljenost preko koje komarci mogu biti privučeni klopkama bez atraktanta, koja je postavljena niz vjetar od živog domaćina, uzima se kao mjera učinkovitosti duljine mogućeg raspršenja mirisa (Clements, 1999). Kako je već prije rečeno, gustoća vegetacije ima značajan utjecaj na duljinu linearnog širenja mirisa, upravo zbog turbulencije koja je uvjetovana vegetacijom. Istraživanjem u Gambiji, potvrđene su neke od ovih tvrdnji. Na otvorenom staništu, postavljene su klopke na polumjerima do 75m od atraktanta, koji su bili dva goveda (102-138kg). Zoofagne vrste rodova *Anopheles, Aedes, Cocquillettidia* i *Culex* različito su reagirale na prisutnost goveda s udaljenosti između 18-36m niz vjetar. Komarci su odgovorili na izvor CO2, mirisni podražaj goveda, koji je bio ekvivalentan ekspiracijskom udjelu dva goveda s udaljenosti od 7,5 do 18m niz vjetar (Gillies & Wilkes, 1972). Iz toga možemo zaključiti kako je koncentracija CO2 u raspršenom mirisu domaćina, opala s obzirom na okolišnu koncentraciju, prije nego su organski konstituenti postali neprepoznatljivi komarcima. Broj komaraca koji se orijentira prema izvoru mirisa domaćina pozitivno je koreliran s tjelesnom masom samog domaćina, te postoji linearan odnos između udjela emitiranog CO2 i udaljenosti s koje je moguće privući komarce (Clements, 1999).

2.6. Orijentacija prema izvoru mirisa domaćina

2.6.1. Aktivacija

Aktivacija predstavlja prvi korak u odgovoru ili ponašanju komaraca na miris domaćina. Općenito se definira kao početna sekvenca cjelokupnog ponašanja komaraca koja za svrhu ima pronalazak i dolazak do domaćina. Nedugo prije aktivacije, komarci se nalaze u „ranging flight“, lete uokolo ali bez mirisnog podražaja ili se odmaraju na vegetaciji. Aktivacija komaraca koji se odmaraju na vegetaciji sadrži dvije komponente: polijetanje i aktivan let. Ukoliko su podraženi mirisom od pokretnog domaćina, aktivirani komarci mogu letjeti direktno prema domaćinu. Ukoliko su podraženi stacionarnim mirisnim podražajem, u kojem ne dolazi do zračnih strujanja, kao što je slučaj u laboratoriju, dolazi do kinetičkog odgovora u ponašanju, na način što povećavaju svoju brzinu leta. Komarci koji se nalaze u „ranging flight“ na otvorenim staništima, lete bez utjecaja vjetra i to brzinom od 3 km/h. u svim smjerovima.

Poznata je činjenica kako CO2 pobuđuje osjetila komaraca, kao i mnogi drugi spojevi u mirisu domaćina. Kada izložimo vrstu *Ae. aegypti* struji zraka, ženke koje se odmaraju, pokazuju malu spontanu aktivaciju s 50% uzletom u periodu od 60 min, ali dodatkom 0,2% CO2 zračnoj struji, postotak aktiviranih ženki podiže se na 65% za samo dvije minute. Iz čega se može zaključiti, kako komarci reagiraju na povećanje koncentracije CO2, češće nego na konstantnu količinu CO2 u zraku. Još veća reakcija komaraca postiže se povećanjem koncentracije CO2 za 0,11% i dodatkom mliječne kiseline. Osim toga, još bolja aktivacija komaraca postiže se ukoliko se u zračnu struju dodaju različite koncentracije CO2 i hlapljivih komponenti ljudskog znoja (Eiras & Jepson, 1991).

Teško je odvojiti faktore koji utječu na aktivaciju komaraca od faktora koji potiču komarce na let uz vjetar do izvora mirisa domaćina, kada ne postoje zračna strujanja. Ova činjenica može se objasniti postojanjem različitih stimulansa na let komaraca uz vjetar, do izvora mirisa domaćina, ali ona nije uvjetovana koncentracijom CO2 ili mirisom domaćina nego samo zračnim strujanjima (Clements, 1999).

2.6.2. Orijentacija prema udaljenijim izvorima mirisa

Atraktivna udaljenost mirisnih podražaja. Pod atraktivnom udaljenošću podrazumijeva se udaljenost raspršenog mirisa od izvora mirisa, na način da je količina raspršenog mirisa u zračnoj struji dovoljna za pobuđivanje osjetilnih receptora i aktivaciju komaraca s obzirom na tip mirisnog podražaja. Istraživanja provedena na području Gambije pokazuju jasan primjer o atraktivnoj udaljenosti mirisnih podražaja. Odgovor prema mirisnom podražaju na određenim udaljenostima od izvora mirisa za vrstu *An. ziemanni, Cq. uniformis, Cx. tritaeniorhynchus* i *An. spp* bio je isti kada je riječ o mirisu goveda, dok je puno niži odgovor za vrstu *An. melas*. Komarci roda *Culex*, koji se hrane krvlju ptica, u velikoj većini slučajeva ne reagiraju na podražaje mirisa goveda niti na CO2. Međutim, za većinu vrsta komaraca, maksimalna udaljenost pri kojoj komarci osjećaju miris domaćina, ista je za goveda i CO2, ali je broj privučenih komaraca različit kod mirisnog podražaja goveda i podražaja s CO2, iz razloga jer govedo osim CO2 emitira i druge komponente mirisa tijela pa je veći broj komaraca privučeno mirisom goveda (Gillies & Wilkes, 1972). Vrsta *An. melas* reagira na skupinu od 5 kokoši, 6 golubova ili 4 patke na udaljenosti od 7m, ali pri udaljenosti od 11m ova vrsta više ne osjeća mirisni podražaj navedenih životinja. Vrsta *Cx. thalassius* reagira na prisutnost golubova s udaljenosti između 7 i 11m, dok pri udaljenosti od 7m ne može prepoznati koncentraciju emitiranog CO2 iz živog pileta, nego je osjeća tek pri udaljenosti od 3m.

Ulaskom potencijalnog domaćina u okolinu u kojoj se nalaze ženke komarca koje se odmaraju na okolnoj vegetaciji, dolazi do pobuđivanja ženki koje se aktiviraju i lete prema izvoru domaćina. U periodu od 10 do 20 min, broj ženki koji slijeću na domaćina opada, zbog sve većeg udjela ženki koje se nalaze u okolini i kojima potencijalni domaćim predstavlja izvor krvnog obroka. Broj ženki koje slijeću na domaćina stabilizira se na razini koja odražava udio imigracije u zonu potencijalnog domaćina. Ukoliko dolazi do češćeg pokretanja domaćina kroz okolinu, nego što se njegov miris raspršio maksimalno po okolini, udio privučenih komaraca će rasti i biti isti kao prilikom prvog ulaska domaćina u okolinu komaraca. Udaljenost preko koje ženke komaraca, koje se odmaraju, mogu reagirati na miris u zraku, bez turbulencije, različit je za pojedine vrste, između 4-5 m za vrstu *Ae. albopictus*, oko 7 m za *Ae. cantans* i 9 m za *Ae. japonicus* (Service, 1971; Nishimura, 1982).

Orijentacija prema izvoru mirisnog raspršenja. Komarci imaju mogućnost dobre orijentacije prema izvoru mirisnog raspršenja, čak i pri velikim udaljenostima (22-36 m) od izvora domaćina. Međutim, jako malo se zna o ponašanju komaraca (letu) prilikom prirodnih raspršenja mirisa domaćina. Tijekom evolucije, kukci su razvili dobre oblike ponašanja, koje se odnose na mogućnost leta prema izvorima urođenih mirisa. Priroda mirisnog odgovora komaraca i sam način leta uvjetovana je strukturom raspršenja, koja ovisi o udaljenosti od izvora mirisa. Iako se malo zna o komarcima na ovu temu, možemo se pozabaviti ce-ce muhama, čiji je let brži od komaraca, ali se pretpostavlja kako im je ponašanje prilikom orijentacije prema izvoru mirisnog raspršenja slično. Ce-ce muhe ulaze u zračnu struju, koja u sebi nosi filamente raspršenog mirisa, obično kada se zračna struja blago usmjerava uz vjetar, koja ih na taj način čuva u raspršenom mirisu. Udio pronalaska izvora mirisa i dolazak do njega, koreliran je s brzinom vjetra, tako da pri brzini vjetra od 0,75 m/s pokazuje pozitivnu korelaciju, a negativnu korelaciju pri brzini vjetra iznad 1,0m/s (Clements, 1999).

Orijentacija prema bližim izvorima mirisa. Pronalazak domaćina podrazumijeva se kada je došlo do uzimanja krvnog obroka, ali krajnja faza sastoji se iz nekoliko koraka: orijentacija prema kraćim izvorima mirisa, slijetanje komaraca na površinu tijela domaćina i ubod, te uzlijetanje i odlazak s domaćina. Prilikom orijentacije prema kraćim izvorima podrazumijeva se sam početak podražaja, kada su komarci prvi put percipirali mirisni podražaj. Navedenoj fazi mogu prethoditi dvije faze; orijentacija prema daljim izvorima mirisa ili faza u kojoj dolazi do aktivacije komaraca nakon odmaranja na okolnoj vegetaciji. Podrazumijeva se da se faza u ponašanju komaraca prilikom orijentacije prema kraćim izvorima mirisa završava kada se komarac nalazi iznad ili u neposrednoj blizini samog domaćina. Prilikom ove orijentacije, osim mirisnih podražaja važno mjesto zauzimaju i vizualni podražaji radi lakšeg lociranja domaćina.

2.7. Istraživanja učinkovitosti mirisnih atraktanata

Nadzor, istraživanje i kontrola komaraca zahtijevaju dobro poznavanje faune komaraca i njihove interakcije s različitim kralježnjacima, koji predstavljaju potencijalnog domaćina. Uzorkovanje ženki koje su u potrazi za domaćinom, od kojeg će uzeti krvni obrok, te na taj način postati mogući vektori, ima važnu ulogu u razumijevanju populacijske dinamike, prostornog rasporeda i arbovirusnog preživljavanja komaraca. (Roiz i sur., 2010; Sanchez-Seco i sur., 2010; Almeida i sur., 2008). Međutim, uzorkovanje ženki komaraca bitno je za procjenu njihovog ponašanja prilikom uzimanja krvnog obroka, koje je karakteristično zbog prijenosnog ciklusa bolesti, te je značajno kako bi se identificirali ključni vektori i njihovi domaćini (Gomez-Diaz & Figuerola, 2010).

Ženke komaraca koje su u potrazi za domaćinom, izložene su raznim vizualnim, mirisnim, gustacijskim (okusnim) i fizičkim podražajima, od kojih mnogi potencijalno mogu djelovati kao naznaka za identifikaciju i lokaciju domaćina. Ponašanje komaraca ili njihov odgovor ponašanjem na pojedine podražaje ovisi o njihovom dobu, spolu, fiziološkom stanju i preferenciji domaćina. Razvoj klopki s mirisnim atraktantima imale su za cilj koristiti općenite atraktante, kao što je CO2, no postalo je jasno tijekom godina istraživanja da se osim atraktanta CO2 pojavljuju i specifični mirisni signali, koji se temelje na osnovi hranjenja ili neki ovipozicijski atraktanti, koji mogu poslužiti kao vrijedan doprinos prilikom proučavanja ponašanja komaraca.

Uloga CO2 prilikomlociranjadomaćina istraživana je u laboratorijskim i terenskim uvjetima, za veliku većinu vrsta (Clements, 1963), nedugo nakon prvog objavljivanja o potencijalu CO2 kao atraktanta za komarce (Rudolfs, 1922). Prve laboratorijske studije sugerirale su da CO2 bolje aktivira komarce (Khan & Maibach, 1966). Nedugo zatim i mnogi drugi istraživači složili su se oko tvrdnje da je CO2  također dobar atraktant na način da povećava broj uhvaćenih komaraca kada se CO2 nalazi uz klopke, bilo s ili bez izvora svijetlosti (Newhouse i sur., 1966; Defoliart & Morris, 1967).

CO2 i miris domaćina atraktanti su koji se prepoznaju na većim udaljenostima od njihovog izvora, te uz pomoć povišene temperature i relativne vlažnosti tijela domaćina doprinose i prilikom orijentacije komarca pri kraćim udaljenostima (Hocking, 1963). Ovaj stav primijenio je i Snow (1970) tijekom svojih istraživanja, koja su pokazala da se značajno smanjuju broj uhvaćenih komaraca kada se ukloni 95,5% CO2 iz zračne struje u koju je dospio iz ljudskog daha, ali ne zapaža se smanjenje udjela broja komaraca koji su došli hraniti se na domaćinu. Smanjenje koncentracije CO2 dovodi do značajnijeg smanjenja u ulovu komaraca za vrste *Culex thalassius* i *Culex tritaeniorhynchus* ali ne i za vrste *Anopheles gambiae* i *Anopheles melas*, sugerirajući na taj način kako je CO2 važan prilikom lociranja domaćina za vrste iz roda *Culex* za razliku od *Anopheles spp*. koji koristite druge mirisne podražaje prilikom lociranja njihovih domaćina (Costantini i sur., 1996). Međutim, postoji i mogućnost da spojevi u ljudskom dahu, osim CO2, nisu uklonjeni iz zračne struje, jer filteri koji služe za uklanjanje CO2 nisu specifični te nemaju mogućnost uklanjanja i drugih spojeva, kao što su karboksilne kiseline i fenoli, koji djeluju prilikom lociranja domaćina za vrste roda *Culex*.

Uspoređivanjem atraktivne udaljenosti između koncentracije CO2 emitirane od strane dva goveda i ekvivalente koncentracije CO2 (50 & 700 ml / min) dokazano je da se vrste *Cx. thalassius* i *Cx. tritaeniorrhynchus* mogu orijentirati prema oba izvora s udaljenosti do 36 m, dok se vrsta *An. melas* orijentira prema količini CO2 s udaljenosti do 36 m, ali se može orijentirati prema govedu s udaljenosti do 55m (Gilles & Wilkes, 1972). Iz ovoga se može zaključiti kako je CO2 najvažniji mirisni atraktant za *Culex spp* (Snow, 1970)*,* dok je za *Anopheles spp*. ipak značajniji miris domaćina sa svim svojim komponentama.

Istraživanjem u zračnom tunelu potvrđeno je kako su komarci vrste *Anopheles arabiensis* i *Culex pipiens fatigans* odgovorili ponašanjem na podražaj CO2 od 0,5%, ali samo kada nije dolazilo do promjene u koncentraciji CO2 (Omer, 1979), što doprinosi potvrđivanju istraživanja koje pokazuje da osjetilni receptori za CO2 reagiraju na promjenu u koncentraciji (Kellogg, 1970). Sposobnost brzih reakcija komaraca na promjene u mirisnim koncentracijama omogućava im razlučivanje između konstantnih koncentracija pojedinih komponenti u zraku, kao što su CO2 i voda, od mirisa domaćina koji se percipira kao povišenje koncentracija različitih spojeva u prirodnim uvjetima (Murlis & Jones, 1981).

Atraktivna svojstva mirisa sisavaca utječu na privlačenje *Glossina sp.* kada ne postoje vizualni podražaji (Vale, 1974). Plinskom kromatografijom analizirani su mirisi goveda, kako bi se utvrdile elektrofiziološki aktivni spojevi, koji bi mogli biti odgovorni za atraktivnost (Cork i sur., 1990). Ovim radom identificiran je velik broja elektrofiziološki aktivnih spojeva, među kojima i 1-octen-3-ol, koji pokazuje značajno veći ulov u klopkama njegovim dodatkom (Vale & Hall, 1985). 1-Octen-3-ol atraktivno djeluje na veliki broj hematofagnih Diptera, uključujući vrste Tabanidae (Krčmar, 2005; French & Kline, 1989), Oestridae (Anderson, 1989), Stomoxyinae (Holloway & Phelps, 1991) i Ceratopogonidae (Kline, 1994; Blackwell & Wadhams, 1995).

Takken i Kline (1989) prvi su koristili 1-octen-3-ol kao atraktant za komarce, kojim je utvrđen značajan broj ulovljenih komaraca vrsta *Ae. taeniorhynchus, An. crucians, Ae. quadrimaculatus* *i Wyeomyia mitchelfii*, kada se uz CDC klopke i svjetlosni izvor dodao octenol u količini između 1,6 i 2,3 mg / h. Ulovi su bili uspoređeni s CDC klopkama uz CO2 kao atraktant s količinom emitiranog CO2 od 200 ml/h. Vrsta *Ae. taeniorhynchus* ne pokazuje atraktivnost prema klopkama u kojima je samo octenol, ali kada se octenol nalazi u klopkama uz CO2 uočavaju se odgovori u ponašanju prilikom ove kombinacije atraktanata (Kline i sur., 1990). Izostajanje odgovora na atraktivno djelovanje octenola za vrste roda *Culex* nedostaje, pretpostavlja se zbog činjenice kako je octenol sastavni spoj mirisa sisavaca, a neke vrste roda *Culex* su isključivo ornitofilne. Daljnja istraživanja na ovu temu dovode do interesantnih zapažanja prema kojima, 35 vrsta komaraca iz rodova *Aedes, Anopheles, Psorophora* i *Coquillettidia* pokazuju atraktivnost prema kombinaciji atraktanata CO2 i octenola (Kline 1994). Zanimljiva činjenica izvodi se iz ovog istraživanja, koja pokazuje da je odgovor komaraca na ove atraktante različit, s obzirom na geografsko, sezonsko i fiziološko stanje komaraca, a koji imaju poseban utjecaj na vrste roda *Anopheles*.

Atraktivno djelovanje fenola i njegovih derivata prvi put zabilježeno je istraživanjem na ce-ce muhama. Utvrđeno je atraktivno djelovanje urina sisavaca na ce-ce muhe (Chorley 1948; Owaga 1985), te je nešto kasnije ova atraktivnost pripisana fenolnim spojevima u urinu (Hassanali i sur., 1986; Bursell i sur., 1988). Od identificiranih osam fenola u mokraći, samo su dva fenola (4 - metilfenol i 3-n-propilfenol) neophodna za maksimalnu atraktivnost za vrstu *Glossina pallidipes* (Vale i sur., 1988). Šest fenola identificiranih u mokraći (3- metilfenol, 4-metilfenol, 3-etilfenol, 4-etilfenol i 2-propilfenol) testirani su kao potencijalni atraktanati za komarce (Kline i sur., 1990). Kombinacija mješavine fenola i octenola privukla je više *Ae. taeniorhynchus* i *Cx. furens* nego bilo koji pojedinačni fenolni spoj ili sam octenol, iako razlike nisu bile statistički značajne.

Kao još jedan atraktan koji se vrlo često koristi kao atraktant za komarce napominje se mliječna kiselina koja je sastavni dio ljudskog znoja. Iako su početkom prošlog stoljeća Howlett (1910), Rudolfs (1922) i Reuter (1936) tvrdili kako ljudski znoj ne pokazuje nikakva atraktivna svojstva na komarace, ovakvi stavovi se novijim istraživanjima mijenjaju. Dokazano je da je razina atrakcija pozitivno korelirana s količinom proizvedenog znoja i da je neovisna o načinu izazivanja znojenja (Khan i sur., 1969). Aceton se pokazao kao još jedan od spojeva iz ekstrakta znoja koji atraktivno djeluje na komarce u prisutnosti 0,1% CO2. Naknadno je utvrđeno kako je glavni sastojak navedenog ekstrakta kože, pored acetona, u velikoj količini i mliječna kiselina (Acree i sur., 1968). Tijekom ranijih istraživanja atraktivnih učinaka ljudskog znoja na komarce morali su se na početku kvantificirati učinci CO2 i vode, prije nego što se odrede učinci drugih atraktanata iz znoja. Na taj način moguće je bilo odrediti atraktivnost drugih komponenti mirisa domaćina, te dokazati da su i drugi spojevi znoja također važni prilikom privlačenja komaraca (Price i sur., 1979). L-mliječna kiselina zajedno s CO2 nema nikakvog utjecaja na ponašanje komaraca pri malim udaljenostima (Eiras & Jepson, 1994). Nizom istraživanja utvrđeno je da ljudska ruka pokazuje najbolje atraktivno djelovanje na komarce za razliku od drugih dijelova tijela (Smith i sur., 1970; Price i sur., 1979; Gillies, 1980).

Unatoč nepobijenim dokazima koji ukazuju na važnost mirisnih znakova domaćina, (CO2 i vlaga), koji su uključeni u ponašanje komaraca prilikom lociranja domaćina, još uvijek nisu dovoljno dobro razvijeni sintetički mamci, koji bi zamijenili prirodne atraktante. Međutim, zbog vrlo složenih spojeva ljudskog mirisa nastaju problemi prilikom razlikovanja učinaka između ljudskog mirisa, temperatura, vlažnost i CO2, na ponašanje komaraca u laboratorijskim uvjetima naspram njihovog ponašanja u prirodnom staništu. Značajan napredak u razvoju sintetičkih mirisnih mamaca učinjen je nedavno, jer su se uspjeli identificirati spojevi mirisa domaćina za različite Diptere (Kline, 1994). Budući da su ovi sintetički mamci napravljeni u laboratoriju na način da oponašaju prirodne atraktante, nije u potpunosti jasno kako bi reagirale prirodne populacije komaraca u staništu. Ovakav pristup je daleko od zadovoljavajućeg s obzirom na važnost komaraca prema ljudima i životinjama.

Drugi pristup identifikaciji atraktanata metodama privlačenja ce-ce muhe, temelji se na osnovi mirisa domaćina (Torr, 1994). Ovaj pristup se oslanjao na sposobnost kvantificiranja ponašanja komaraca i učinak mirisa domaćina na određene vrste komaraca, u odnosu na druge mirisne srodne podražaje, kao što su gradijenti temperature, vlage i CO2. Nakon identificiranja prirodnih atraktanta, koji su mirisi domaćina, može doći do određivanja elektrofiziološki aktivnih sintetičkih spojeva koji su u mogućnosti oponašati prirodne kariomone (Cork i sur., 1990). Na taj način bi se stvorio novi aktivni spoj, koji bi mogao biti različitog omjera komponenti, čime bi došlo do povećanja atraktivnost i specifičnosti u laboratorijskim i terenskim istraživanjima. Međutim, ovakav pristup još uvijek ima niz nespecifičnosti i problema, te na taj način još uvijek nemamo karakterističan sintetski spoj koji bolje privlači komarce od prirodnih atraktanata domaćina.