Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Pravidla buněčného škálování mozku u pěvců

Diplomová práce

Martin Kocourek

Vedoucí diplomové práce Mgr. Pavel Němec, Ph. D.

Konzultant Mgr. Seweryn Olkowicz, Ph.D.

V Praze 2013

Prohlášení:

Tato diplomová práce byla vypracována na katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením Mgr. Pavla Němce.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně. Pokud jsem použil výsledků z již publikovaných prací, řádně je cituji a uvádím v seznamu literatury.

……

Praha 15. 8. 2013

Poděkování:

Hlavní dík patří školiteli mé diplomové práce Mgr. Pavlu Němcovi, Ph.D. a konzultantu Mgr. Sewerynu Olkowiczovi, Ph.D. za čas, který věnovali mému zasvěcení do mystérií, jež obklopují ptačí mozek. Tímto jim děkuji za cenné rady, připomínky a v neposlední řadě i poskytnutou literaturu.
Poděkování však patří i všem mým blízkým a přátelům, bez kterých bych neměl čas ani prostředky, které byli k dokončení této práce nepostradatelné.
A v neposlední řadě děkuji i všem čtenářům této práce. Snad Vás bude více než členů komise.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt č. 851613).

Abstrakt

U mnoha pěvců, především u krkavcovitých, byly demonstrovány kognitivní schopnosti srovnatelné s těmi, pozorovanými u primátů. Aby bylo možné analyzovat, jak jsou tyto podobnosti reflektovány na buněčné úrovni, stanovil jsem, s použitím metody izotropické frakční homogenizace, počty neuronů a nonneurálních buněk v mozcích pěvců. Podařilo se mi prokázat, že počty neuronů škálují téměř izometricky s velikostí koncového mozku, tj. průměrná velikost neuronu, se zvětšováním hmotnosti mozku mírně zvětšuje a hustota neuronů se nepatrně snižuje. Hustota neuronů v koncovém mozku pěvců je 3-6 x vyšší než v mozkové kůře primátů. Počet neuronů v koncovém mozku krkavce velkého (*Corvus corax*) je proto srovnatelný s počtem neuronů v mozkové kůře malých opic. Mozeček podléhá velmi obdobným pravidlům buněčného škálování. Jeho velikost je však relativně menší než u savců, a proto je i procentuální podíl neuronů mozečku na celkovém počtu neuronů mnohem menší, než je tomu u savců. V příkrém rozporu s malou variabilitou hustot neuronů pozorovaných v koncovém mozku a mozečku, hustota neuronů v mezimozku, tectum opticum a mozkovém kmeni rapidně klesá se zvětšováním těchto struktur. U všech studovaných struktur zůstává hustota nonneurálních buněk víceméně stejná, bez ohledu na velikost dané struktury, což odpovídá situaci popsané u savců. Získané výsledky silně naznačují, že vysoký počet neuronů a tedy vysoká procesní kapacita mozku tvoří neurální substrát pro komplexní chování a kognitivní schopnosti pěvců.

Klíčová slova: alometrie, velikost mozku, srovnávací neuroanatomie, počet gliových buněk, počet neuronů, izotropická frakční homogenizace.

Abstract

Many passerine birds, particularly corvids, are known to express complex cognitive skills comparable to those observed in primates. In order to examine how these similarities are reflected at the cellular level, I counted neurons and nonneuronal cells in passerine brains using the isotropic fractionator method. I show that, in these birds, neuronal numbers scale almost isometrically with telencephalic size, i.e., the average neuron size shows little increase and neuronal density decreases minimally as brains get larger. Neuronal densities in the passerine telencephalon exceed those observed in the primate cerebral cortex by a factor of 3-6. As a result, the number of telencephalic neurons in the Common Raven (*Corvus corax*) equals those observed in the cerebral cortex of small monkeys. The cerebellum features similar scaling rules. However, because the relative size of the cerebellum is smaller than in mammalian brains, cerebellar neurons make a much smaller proportion of total brain neurons than in mammals. In contrast to the little variation in neuronal densities in telencephalon and cerebellum, the density of neurons rapidly decreases with increasing structure size in the diencephalon, optic tectum and brain stem. For all examined brain structures, the densities of nonneuronal cells remain constant regardless of structure size, a finding congruent with data from mammals. Findings strongly suggest that high neuronal numbers and hence high brain's computational capacity underpin the behavioural and cognitive complexity reported in passerine birds.

Key words: allometry, brain size, comparative neuroanatomy, number of glia, number of neurons, isotropic fractionator.

Obsah

1. ÚVOD 9

1.1. Historie metod počítání neuronů.....9

1.2. Srovnávací analýzy relativní velikosti mozku.....10

1.3. Izotropická frakční homogenizace 13

1.4. Specifita ptačího mozku.....17

1.5. Kognitivní schopnosti ptáků 19

1.6. Srovnávání velikosti ptačího mozku.....20

1.7. Cíle práce.....22

2. MATERIÁL A METODIKA.....23

2.1. Materiál.....23

2.2. Příprava material 23

2.3. Kvantifikace počtu mozkových buněk.....25

2.4. Statistická analýza dat.....28

3. VÝSLEDKY.....29

3.1. Škálování hmotnosti mozku a jeho částí.....30

3.2. Škálování počtu neuron a nonneuronálních buněk.....34

3.3. Škálování hustot neuron a noneuronálních buněk 40

3.4. Škálování poměru neuron a nonneuronálních buněk 42

4. DISKUZE 43

4.1. Srovnání pěvců a savců 43

4.2. Možný vliv domestikace a věkuna počet neuronů.....48

5. ZÁVĚR 51

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 53

1 Úvod

1.1 Historie metod počítání neuronů

Když Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz ve své práci Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems (1891) poprvé definoval pojem neuron, neuváženě jej označil jako nespočetnou základní stavební jednotku nervového systému. Nedokázal plně odhadnout lidskou touhu věci kvantifikovat, ohodnotit a srovnávat. A tak se, již krátce poté co byla teorie neuronálního uspořádání nervové soustavy definitivně potvrzena (Cajal 1911, 1933), objevily první pokusy o stanovení počtu neuronů. Bylo použito velké množství metod a přístupů od nejrozšířenějšího přímého počítání pomocí mikroskopu, přes užití fotografií, projekcí, fotometrických a optických metod a homogenizace (přehledový článek, viz Konigsmark 1970). Většina těchto metod se potýkala s nejrůznějšími nedostatky, například s nízkým rozlišením a s tím spojenou nesnadnou identifikací neuronů a nonneuronálních buněk, nestandardizovanou tloušťkou řezů a náhodným vzorkováním.

Zavedení stereologických metod, tedy znamenalo významný pokrok. K prvnímu návrhu na využití stereologických metod, při stanovování počtu neuronů, došlo již v roce 1946 (Abercrombie 1946). Stereologickými metodami jsou myšleny metody, které, na základě geometricko-statistických úvah, získávají představu o prostorovém uspořádání struktury přímým odvozením metrických vlastností struktury získaných na plošném obrazu řezu. Existují dvě hlavní kategorie těchto metod. Model-based nebo také Assumption-based metody (metody založené na modelových předpokladech), které vycházejí z předpokladů o tvaru a velikosti kvantifikovaných objektů. Ideálně měly tyto objekty být pravidelného tvaru a velikosti. Taková situace je však v biologii nereálná, a tak bylo nutno aplikovat různé korelační faktory a konstanty. Jak popisuje West (1999), tyto metody počítaní se používaly do začátku 90. let 20. století. Od té doby převládají Design-based metody (metody založené na vhodném designu), které jsou založeny na vhodném, předem určeném odběru vzorků. Díky tomu nejsou závislé na velikosti, tvaru a prostorovém rozložení zkoumaných objektů.

Limitujícím faktorem těchto metod je jejich časová náročnost. Variabilita je totiž, zjednodušeně řečeno, nepřímo úměrná počtu zpracovaných vzorků, a jelikož přirozená variabilita tkání je vysoká, je třeba zpracovat dostateční množství vzorků. Tuto překážku vyřešili Suzana Herculano-Houzel a Roberto Lent (2005,2012) svou metodou Izotropické frakční homogenizace (Isotropic Fractionator). Tato metoda je založena na tom, že je vysoce anisotropická struktura mozku přeměněna na homogenní isotropickou suspenzi volných jader buněk, které jsou poté pomocí imonucytochemických metod snadno identifikovatelné jako neurony.

1.2. Srovnávací analýzy založené na relativní velikosti mozku

Naprostá většina prací, pokoušejících se o kvantifikaci neuronů, se věnovala přímo lidskému mozku (např. Thompson 1899, Pakkenberg 1966, Pakkenberg&Gundersen 1997), nebo nesystematicky zpracovávala běžná laboratorní a velká ikonická zvířata (Tower 1954, Lange 1975). Naproti tomu existuje velké množství dat o hmotnosti mozku různých skupin obratlovců, především savců a ptáků (např. Stephan 1961, 1967, Russell 1979, Jerison 1973, Mlikovský 1989a, 1989b, 1989c, 1990, Iwaniuk & Nelson. 2002; Garamszegi & Eens 2004). Na těchto datech bylo demonstrováno, že velikost mozku roste negativně alometricky s velikostí těla, tj. se směrnicí logaritmického vynesení menší než jedna (viz např. Jerison 1973, Martin I983). Mocninná funkce popisující vztah mezi hmotností mozku a hmotností těla ($MBr=a \times MBo^b$) byla následně popsána pro mnoho skupin obratlovců (např. savci – Martin I983). Mocninnou funkci je možné převedením do logaritmické škály zlinearizovat ($\log MBr = \log a + b \times \log MBo$) tak, že při vynesení hodnot na grafu je škálovací koeficient b směrnicí přímky udávající její sklon a koeficient $\log a$ její průsečík s osou Y. Relativní velikost mozku, odvozená z alometrického vztahu mezi velikostí mozku a těla, tzv. encefalizace byla pak široce používána jako měřítko výpočetní kapacitu mozku, potažmo kognitivních schopností toho kterého druhu. Takzvaný encefalizační kvocient pro daný druh je odvozen jako podíl skutečné (pozorované) velikosti mozku a velikosti mozku pro danou tělesnou hmotnost předpokládané z příslušného alometrického vztahu. (viz např. Jerison 1973, Jerison & Barlow 1985).

Jak shrnují Williams & Herrup (1988) škálovací koeficient nabývá hodnot mezi 0,1-0,8 (Stephan 1961, 1967, Lande 1979, Ricklefs & Marks 1985). Hodnotu tohoto koeficientu výrazně ovlivňuje také šíře taxonomické jednotky, která je zahrnuta do analýzy. Pokud jsou analyzovány řády či jiné vyšší taxony, jsou exponenty zpravidla vyšší; při analýze vnitrodruhové variability nebo variability na úrovni příbuzných druhů koeficient zpravidla nabývá hodnot nižších než 0,4 (Kretschmann & Wingert 1969, Holloway 1980). Avšak i při srovnání příbuzných rodů se můžeme setkat s koeficienty, které budou relativně vysoké (Mann, Towe & Glickman 1986). Tyto výjimky jsou způsobeny jak různými ekologickými proměnnými, jakými jsou potravní strategie a výběr stanoviště (např. Eisenberg & Wilson 1978; Harvey, Clutton-Brock & Mace 1980; Mace, Clutton-Brock & Harvey 1980), tak i fylogenetickými a ontogenetickými faktory, jako jsou velikost těla, rychlost metabolismu a délka gravidity (např. Martin 1981; Mink, Blumenschine & Adams 1981; Armstrong 1983). Srovnávací analýzy tohoto typu byly nejběžnější v 70. a 80. letech minulého století. Postupně se však jejich počet snižoval, až téměř vymizely. Stalo se tak nejspíše proto, že všechny možná srovnání, která tehdy dostupná data umožňovala, byla již provedena (Healy & Rowe 2007).

V posledním desetiletí však podobně tématicky zaměřené práce zažívají svou renesanci (např. Lefebvre et al. 2004, Beauchamp & Fernandez-Juricic 2004, Iwaniuk & Hurd 2005, Maklakov et al. 2011). Tyto práce využily stále se rozšiřující množství informací o velikostech mozku (např. již zmiňovaný Mlikovský 1990) a přinesly sebou několik metodologických inovací, jako jsou vícerozměrová statistika a evo-devo přístupy. Výsledky těchto studií demonstrovaly, jaký vliv na vývoj velikosti mozku mají energetická (např. Isler & van Schaik 2009a, Navarrete et al. 2011) a vývojová omezení (např. Finlay & Darlington 1995, Finlay et al. 2001) a nejrůznější selekční tlaky. Jako výrazné koreláty relativní velikosti mozku byly identifikovány například délka života (Allman et al. 1993), reakce na nové prostředí (Sol et al. 2005a, 2008; Amiel et al. 2011), nebo schopnost sociální interakce (Dunbar & Shultz 2007, Smaers et al. 2012, Beauchamp & Fernandez-Juricic 2004, Burish et al. 2004, Emery et al. 2007, Burish et al. 2004, Pollen et al 2007). Bohužel všechny výše zmíněné studie používají jako proximaci výpočetní kapacity relativní velikost mozku. Roli neuronu, jako základní výpočetní jednotky mozku, jak ve své práci formulovali již McCulloch & Pitts (1943), nebyla v těchto studiích věnována takřka žádna pozornost.

Důkazy o vlivu počtu neuronů na inteligenci existují již od poloviny minulého století. Triploidní (Fankhauser et al 1955) a tetraploidní (Vernon & Butsch 1957) čolkové zelenaví (*Notophthalmus viridescens*), měli mozek o stejné hmotnosti jako diploidní jedinci tohoto druhu. Jejich neurony však byli mnohem větší, a jejich počet dosahoval 50-70 % počtu neuronů u diploidních jedinců. K naučení se cesty bludištěm pak tito polyploidní čolci potřebovali 2-3x více pokusů. Přes nižší schopnost učení však nebyl pozorován žádný vliv na běžnou lokomoci. Dalším známým příkladem jsou sezónní změny v počtu neuronů ve vokálním jádře (hyperstriatum ventrale, pars caudalis; HVc) u kanára, které korelují se schopností zpívat (Goldman & Nottebohm 1983). Korelaci mezi počtem neuronů ve vokálním jádře a schopností zpívat potvrdili i mnozí další (např. Spencer et al. 2005). U zvířat, která byla infikována parasitem, bylo pozorováno zjednodušení jejich repertoáru, a zároveň došlo ke zmenšení hmotnosti HVc. Zmenšení celkové hmotnosti mozku však u těchto zvířat pozorováno nebylo (Spencer et al. 2005).

Ve světle těchto důkazů tedy bylo jen otázkou času, kdy se začnou objevovat práce, které budou k dané problematice přistupovat odlišně. Deaner et al (2007) zdůraznil závěr své práce, že absolutní hmotnost mozku koreluje s kognitivními schopnostmi primátů daleko lépe než velikost relativní, již jejím názvem (Celková hmotnost mozku, a ne encefalizační koeficient, nejlépe predikuje kognitivní schopnosti subhumánních primátů; Overall brain size, and not encephalization quotient, best predicts cognitive ability across non-human primates). Pokud přihlédneme k zvyšujícímu se počtu prací, jež potvrzují přímou korelaci mezi velikostí mozku a jeho vnitřní komplexitou, potažmo přímo s množstvím neuronů v něm obsažených (Striedter 2005, Herculano-Houzel 2011a), lze Deanerovo prohlášení chápat jako potvrzení nového pohledu na tuto problematiku. Naštěstí se však již objevují i práce, které pracují přímo s množstvím neuronů (např. Herculano-Houzel et al. 2006, 2007), případně s počtem korových neuronů a jejich spojů (Roth & Dicke 2005). Jakkoli nelze vyloučit významný příspěvek dendritů axonů k výpočetní funkci neuronu (Sidiropoulou et al. 2006, Cuntz 2012), zdá se být z hlediska dnešních technických možností nejlepší dostupnou aproximací výpočetní kapacity mozku počet neuronů (Herculano-Houzel 2012b).

1.3. Izotropická frakční homogenizace

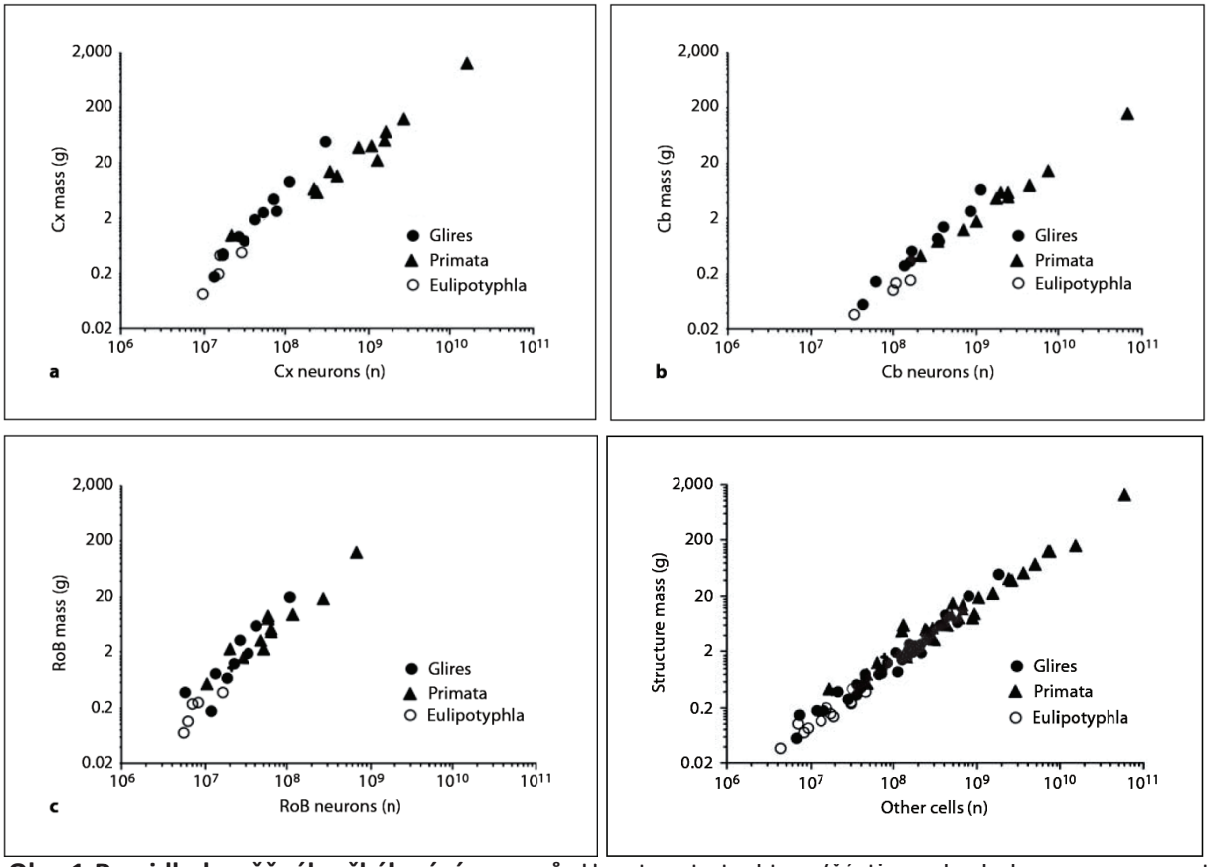
Metoda Izotropické frakční homogenizace byla za dobu své krátké existence použita ve velkém množství prací (např.: Herculano-Houzel et al. 2006,2007; Azevedo et al. 2009, Morterá & Herculano-Houzel 2012) a přinesla již několik zajímavých výsledků. O její popularitě svědčí i skutečnost, že bylo publikováno několik návrhů na její další zefektivnění. Collins et all. (2010) navrhli identifikovat a kvantifikovat neurony a nonneuronální buňky pomocí průtokového cytometru. Azevedo et al. (2013) publikovali přístroj, díky kterému je procedura homogenizace automatizována. Do současné doby byla tato metoda použita k analýze buněčného škálování CNS u 3 řádů savců. Zpracováno bylo 14 druhů primátů. Jsou to *Otolemur garnettii*, *Callithrix jacchus, Aotus trivirgatus*, *Saimiri sciureus*, *Macaca mulatta*, *Cebus apella* (Herculano-Houzel et al 2007)*, Homo sapiens* (Azevedo et al. 2009)*, Microcebus murinus, Callimico goeldii*, *Macaca fascicularis*, *Macaca radiata, Papio cynocephalus* (Gabi et al. 2010) a *Pongo sp.* a *Gorilla gorilla* (Herculano-Houzel & Kaas 2011). Dále bylo zpracováno 10 zástupců skupiny Glires: *Mus musculus*, *Mesocrycetus auratus*, *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus, Dasyprocta primnolopha*, *Hydrochoerus hydrochoeris* (Herculano-Houzel et al. 2006) a *Proechimys cayennensis*, *Cynomys* sp., *Sciurus carolinensis, Heterocephalus glaber*, *Oryctolagus cuniculus* (Herculano-Houzel et al. 2011). Zpracováno bylo také 5 druhů hmyzožravců (Eulipotyphla): *Sorex fumeus*, *Blarina brevicauda*, *Condylura cristata*, *Parascalops breweri*, *Scalopus aquaticus* (Sarko et al. 2009). Z komunikace s autorkou této metody vyplynulo, že v současné době jsou zpracováváni zástupci dalších skupin savců - chobotnatci, kopytnatci a kytovci (Herculano-Houzel, osobní sdělení).

Z výše uvedených prací pak jasně vyplývá, že pravidla škálování, podle kterých se zvyšujícím se počtem neuronů dochází ke zvýšení hmotnosti mozku, se mezi jednotlivými savčími řády výrazně liší. Pokud porovnáme primáty a hlodavce, objevíme až nečekaně velké rozdíly v počtech neuronů u druhů se srovnatelně velkým mozkem. Herculano–Houzel (2011b) pro ilustraci tohoto faktu používají srovnání korových neuronů u mirikiny (*Aotus trivirgatus*,) a agutiho (*Dasyprocta primnolopha*). Mozek agutiho váží 17,7g, mozek mirikiny 15,7g. I přes zřetelný váhový handicap, v lemurově mozku najdeme téměř 2krát více neuronů, přibližně 1,5 miliardy. U agutiho je to pouhých 795 milionů. Tento rozdíl ukazuje, že u primátu je ve stavbě mozku kladen důraz především na efektivitu uspořádání a úsporu místa, zatímco

hlodavci nejsou prostorem nijak omezováni. U hmyzožravců, stejně jako u hlodavců, se hmotnost mozku zvyšuje výrazně rychleji než počet neuronů (Sarko et al. 2009). Výše popsaná pravidla však platí pouze pro celý mozek. Pravidla škálování hmotnosti se zvyšujícím se počtem neuronů se v jednotlivých částech mozku liší. Tyto práce člení mozek na 3 oblasti: koncový mozek, mozeček a zbylé části. V koncovém mozku primátů, stejně jako v mozečku, byla korelace mezi hmotností mozku a počtem neuronů lineární. U Glires a hmyzožravců je nárůst počtu neuronů spojen s disproporčním nárůstem hmotnosti (viz Obr. 1A). V mozečku však platí odlišná pravidla škálování (viz Obr 1B). A tak zatímco se koncový mozek Glires a hmyzožravců choval stejně, v mozečku toto neplatí. U druhů ze skupiny Glires je, stejně jako v koncovém mozku, nárůst hmotnosti daleko výraznější než nárůst počtu neuronů. U hmyzožravců se hmotnost zvyšuje s rostoucím počtem neuronů lineárně, tedy stejně jako u primátů. Tento fakt je opět nejlépe pozorovatelný při srovnání mozečku o stejné váze. Mozeček makaka (*Macaca radiata*) při váze 5,7 g obsahuje 2 miliardy neuronů. V mozečku kapybary (*Hydrochoerus hydrochoeris)* vážícím 6,6 g pak nalezneme o téměř polovinu neuronů méně; konkrétně 1,2 miliardy (Herculano-Houzel et al. 2006,2007). Tyto hodnoty se mohou zdát vysoké, avšak velikost neuronů v mozečku je proti neuronům v koncovém mozku menší a tudíž mozeček vykazuje mnohem vyšší hustotu neuronů než mozek koncový. Ve zbývajících částech mozku je situace poněkud nepřehledná a jednotlivé taxony nejde jednoznačně odlišit. Je tedy možné, že v těchto strukturách jsou pravidla škálování uplatňována stejně u primátu jako u glires a hmyzožravců (viz Obr. 1C; Herculano-Houzel 2011b). U všech těchto skupin je uváděn také počet nonneuronálních buněk. Tato hodnota však nevykazuje žádnou taxonovou specifitu. Nenajdeme zde ani žádné rozdíly mezi jednotlivými strukturami (viz Obr. 1D). Množství nonneuronálních buněk tak velmi dobře koreluje s hmotností odpovídající části mozku, a to u všech taxonů (Herculano-Houzel 2012c).

Další zajímavostí, kterou ukazují tato data je, že rozložení počtu neuronů neodpovídá tomu, jak je rozložena hmotnost mezi koncový mozek a mozeček. V žádném z těchto 3 taxonů nenajdeme korelaci mezi rozložením relativní hmotnosti mezi jednotlivé části mozku a mezi rozložení relativních množství neuronů v nich obsažených. Podle velikosti by se dalo předpokládat, že většina neuronů se bude nacházet v koncovém mozku. Avšak skutečnost je

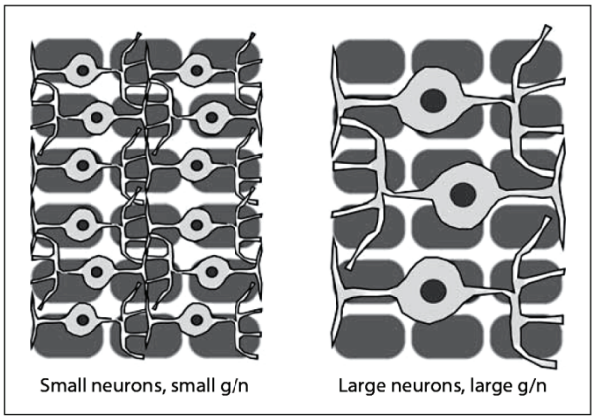
jiná. Například u člověka najdeme v mozkové kůře pouze 19 % všech mozkových neuronů, zato v mozečku nalezneme více než 80 % neuronů z celkového počtu (Azevedo et al. 2009). Přes všechny rozdíly ve škálování mezi taxony a strukturami, je vždy zachován poměr počtu neuronů 4,2:1 ve prospěch mozečku (Herculano-Houzel 2012c). Potvrzuje tak závěry z šetření, které bylo provedeno již dříve na omezeném množství druhů (Herculano-Houzel 2010). To, že nárůst počtu neuronů je konstantní v obou strukturách, plně zapadá do současného náhledu, kdy je koncový mozek a mozeček předmětem stejných selekčních tlaků a vyvíjí se koordinovaně (Whiting a Barton, 2003). Ve strukturách, které jsou zahrnuty pod pojmem ostatní části, je situace u primátů a Glires poněkud odlišná. Procentuální zastoupení neuronů v těchto částech mozku klesá s jeho zvyšující se hmotností (Herculano-Houzel 2011b).



Obr. 1 Pravidla buněčného škálování u savců. Hmotnost struktury/části mozku byla vynesena proti počtu neuronů v koncovém mozku (A), mozečku (B), zbylých částech mozku (C) a proti počtu nonneuronálních buněk (D).

Zdroj: Herculano-Houzel 2011b

Výše uvedené práce (Herculano-Houzel et al. 2006,2007; Azevedo et al. 2009 a další.) se věnují také hustotě a tudíž i velikosti buněk. U nonneuronálních buněk je situace jednoznačná. Díky lineárnímu vztahu mezi hmotností a počtem nonneuronálních buněk je i jejich hustota přibližně konstantní a nijak tedy nekoreluje s růstem hmotnosti. Naproti tomu v hustotě neuronů najdeme rozdíly jak mezi jednotlivými částmi mozku, tak mezi jednotlivými taxony (Herculano-Houzel 2012c).



Obr. 2 Změna velikosti poměru nonneuronálních buněk a neuronů v závislosti na změně velikosti neuronů. Velikost nonneuronálních buněk zůstává zachována a za změnu v poměru může pouze změna velikosti neuronů.

Zdroj: Herculano-Houzel 2011b

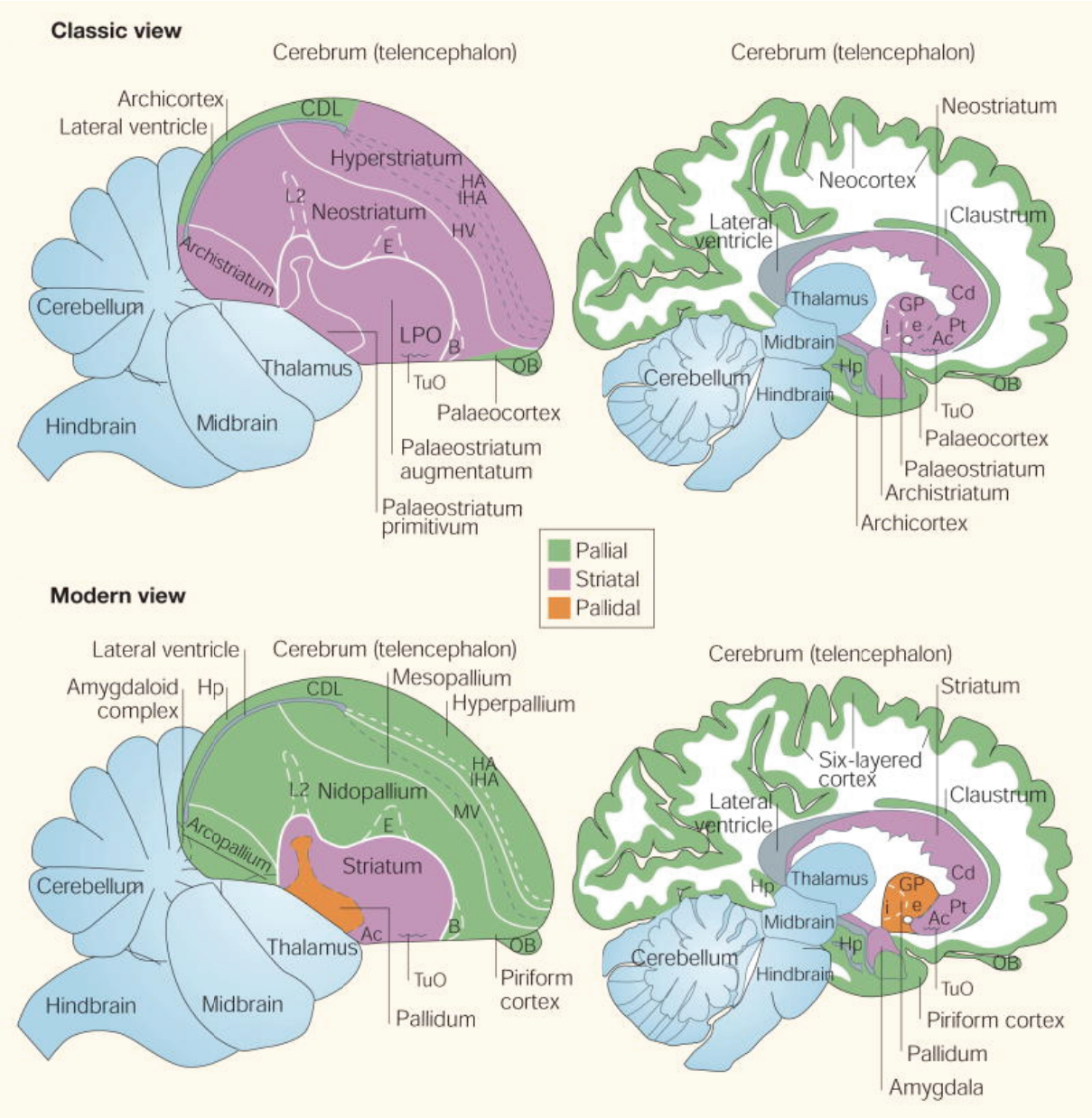
V koncovém mozku se hustota neuronů se zvyšující se hmotností poměrně výrazně snižuje u Glires a hmyzožravců, zatímco u primátu je toto snížení pouze nepatrné. Jak by se dalo čekat podle předchozích údajů, v mozečku vše vypadá opět jinak. U Glires sice dochází ke snížení hustoty s nárůstem hmotnosti mozečku, u primátů a hmyzožravců je však hustota poměrně stabilní. V ostatních částech mozku se pak hustota neuronů snižuje napříč všemi taxony podobně (Herculano-Houzel 2012c). Pokud tedy přihlédneme ke konstantní hustotě nonneuronálních buněk a faktu, že hustota neuronů se snižuje, můžeme tvrdit, že průměrná velikost neuronu se zvětšuje. To také znamená, že poměr neuronů a ostatních buněk je přímo úměrný velikosti neuronů, protože hustota a počet ostatních buněk se nemění a jejich velikost je tudíž stejná (viz Obr. 2; Herculano-Houzel 2011b). Pokud shrneme všechny závěry těchto výzkumů, můžeme opět prohlásit, že pro srovnání inteligence jednotlivých druhů je počet neuronů nejvhodnějším dostupným měřítkem. Vzhledem k taxonomicky specifickým pravidlům škálování nárůstu počtu neuronů lze v případě blízce příbuzných druhů použít i absolutní velikost mozku. Toto měřítko však nemůžeme použít v široce pojatých

srovnávacích studiích. Na základě alometrických rovnic pro růst mozku v závislosti na počtu v něm obsažených neuronů lze například odvodit, hypotetický hlodavčí mozek o váze 1,5 kg by obsahoval pouhých 12 miliard neuronů. Pro srovnání, lidský mozek obsahuje asi 86 miliard neuronů (Herculano-Houzel 2012c).

1.4. Specifita ptačího mozku

Způsob, jakým byl po dlouhá desetiletí ptačí mozek vnímán, má své kořeny, stejně jako všechny ostatní důležité biologické objevy, v Darwinově díle O původu druhů (1859). Jeho evoluční teorie a v té době ještě stále „ikonická" Aristotelova koncepce známa jako „scala naturae" vytvořily předpoklady k tomu, aby byl ptačí mozek vnímán pouze jako určitý mezistupeň na cestě k ideálu: mozku člověka. Ludwig Edinger, otec srovnávací neuroanatomie, pak tuto představu zhmotnil ve své sjednocující teorii evoluce mozku, kterou publikoval mezi léty 1885-1908 (Jarvis et al. 2005). Ptačí mozek byl Edingerem a dalšími ranými srovnávacími neurobiology považován za strukturu tvořenou převážně bazálními ganglii. Tento pohled zaškatulkoval ptáky jako tvory, jež jsou ovládáni svými pudy a instinkty, a u kterých nenajdeme žádné stopy samostatné inteligence. Tato pozorování byla podpořena i použitím slepic, holubů a křepelek jako modelových organismů v raných etologických studiích (např. Lorenz 1950, Tinbergen 1951). A přestože byl tento pohled hlavně v druhé polovině minulého století často zpochybňován, nebyl nikdy formálně změněn (Jarvis et al 2005). Na konci 20. století však byla situace neudržitelná a bylo navrženo nové názvosloví jednotlivých částí ptačího mozku (Reiner et al. 2004). Od roku 2000 se začalo formovat mezinárodní The Avian Brain Nomenclature Consortium a díky soustavné práci zúčastněných odborníku vznikla nová pojmenování, která odráží současný pohled na evoluci ptačího mozku. O ptačím mozku uvažuje v kontextu jeho plazích předků a dělí telencephalon na část palliální, striátní a palidální. Přes odlišné uspořádání (jednotlivá jádra vs. vrstvy), pallium u ptáků a savců vykazuje podobnou funkci a můžeme zde nalézt podobné dráhy (Jarvis 2009). Rozdíly mezi oběma třídami jsou pouze nepatrné jak ve striatu, tak v pallidu (viz Obr. 3). Při přejmenování jednotlivých center, byl brán zřetel na jejich homologii s centry v savčím mozku. Zároveň byly odstraněny všechny předpony, které zdůrazňovali domnělé

evoluční stáří struktury (paleo- , archi- a neo-). Tyto předpony byly navíc použity poněkud nepřesně, neboť v řečtině znamená archi- nejstarší a paleo- pouze starý. Jejich význam byl tedy v původní Edingerově názvosloví prohozen (Jarvis et al 2005).



Obr. 3 Srovnání nomenklatury. Horní řádek poskytuje přehled „Edingerovské“ nomenklatury u ptáků (nalevo) a u savců (napravo). Ve spodním řádku je použito recentní názvosloví

Zdroj: Jarvis et al. 2005

1.5. Kognitivní schopnosti ptáků

Ptáci mají širokou paletu schopností, z nichž některé byly donedávna přisuzovány pouze primátům (např. Pepperberg 2002, Butler et al. 2005, Emery 2006). Například Fersen & Delius (1989) uvádějí, že holub si je schopen zapamatovat až 725 různých vizuálních obrazců. Holubi také dokáží rozlišit mezi malbami Picassa a Moneta (Watanabe, Sakamoto & Wakita 1995) a občas dokonce lhát (Lanza, Starr & Skinner 1982). Přes všechny tyto výkony jsou za „nejchytřejší" ptáky považováni papoušci a krkavcovití (např. Pepperberg 2002, Seed et al. 2009). Například vrána novokaledonská (*Corvus moneduloides*) dokáže vyrábět a používat nástroje k získání potravy (Hunt 1996, Hunt & Gray 2004) a je schopna řešit složité fyzikální problémy pomocí kauzálního a analogického myšlení (Taylor et al. 2007, 2009). U těchto vran bylo také pozorováno, že ve srovnání s ostatními krkavcovitými mají jejich mozky vetší hmotnost (Cnotka et al. 2008). Výjimečné dovednosti však byly pozorovány i u ostatních krkavcovitých. I když havrani (*Corvus frugilegus*) nástroje ve volné přírodě pravděpodobně nepoužívají, v laboratorních experimentech bylo jejich použití prokázáno (Tebbich et al 2007; Bird a Emery 2009a, b). U sojky (*Aphelocoma coerulescens*) byla prokázána existence epizodické paměti (Clayton & Dickinson 1998) a u straky (*Pica pica*) zase schopnost rozpoznání sebe sama v zrcadle (Prior et al. 2008).

Papoušek šedý (*Psittacus erithacus*) je schopen pokročilé verbální komunikace (Pepperberg 2002), počítání (Pepperberg & Gordon 2005) a je schopen object permanence, tzn. objekt si zachováva svou existenci a místo v prostoru i poté, co nám zmizí z dohledu (Pepperberg a Funk 1990). Novozélandský nestor kea (*Nestor notabilis*), je schopný řešit problémy vhledem a bez nutnosti aplikace metody pokus omyl (Huber & Gajdon 2006, Schloegl et al. 2009). Nedávno byly publikovány také studie, které prokázaly schopnost plánovat si své potřeby do budoucna u kakadu goffini (*Cacatua goffini*; Auersperg et al. 2013). Díky všem těmto dovednostem je jasné, že šestivrstvý isokortex savců není jediná možnost uspořádání, která by umožňovala rozvoj složitějšího myšlení. Pallium u ptáků, jenž je členěno do jednotlivých center, umožňuje tyto dovednosti rozvíjet též (Kirsch et al. 2008).

1.6. Srovnávání velikosti ptačího mozku

Relativní velikosti ptačích mozků jsou plně srovnatelné s relativními velikostmi mozků u savců a jsou výrazně větší než relativní velikosti mozků plazů (např. Jerison 1973, Nieuwenhuyis et al. 1998). Podstatným rozdílem je, že u ptáků se velký mozek vyvinul nezávisle v několika liniích. Zatímco u placentálních savců najdeme druhy s největšími mozky pouze mezi primáty a kytovci, 10 % ptačích druhů s relativně největšími mozky najdeme v 7 různých řádech (Bucerotiformes, Psittaciformes, Piciformes, Strigiformes, Passeriformes and Ciconiiformes; Nealen & Ricklefs 2001). Za nejvíce encefalizované druhy jsou považováni papoušci a pěvci z čeledi krkavcovitých (Mlikovsky 1990, 2003). Na opačném pólu spektra se pak nalézají zástupci běžců, hrabavých a měkkozobích (Mlikovsky 1989a, 1989b, 1989c, 1990). Zdá se tedy, že existuje spojení mezi relativní velikostí mozku a typem mláďat. Druhy s prekociálními (nidifugními) mláďaty mají většinou menší mozky než druhy s altriciálními (nidikolními) mláďaty (Starck & Ricklefs 1998, Iwaniuk & Nelson 2003). Zdá se tedy, že altricialita, díky prodloužení doby vývoje a růstu mozku o období krmení, umožnila vznik druhů s většími mozky (Starck & Ricklefs 1998). Podle hypotézy „drahé tkáně“ je potřeba na jeho zvětšení buďto zvýšit přísun energie anebo omezit výdaje na jiné, méně potřebné tělesné funkce. Tato teorie také poskytuje vysvětlení, proč u těchto druhů častěji najdeme zpomalený vývoj, menší počet mláďat a péči obou rodičů nebo i tzv. helperů (Isler & van Schaik 2009a, b). Uvádí se, že péče obou rodičů se alespoň občas vyskytuje až u 81 % a kolektivní péče u 9 % druhů ptáku (Cockburn 2006).

Jak shrnují Lefebvre et al. (2013), relativní velikost koncového mozku koreluje s množstvím behaviorálních inovací (Lefebvre et al. 1997) a se schopností adaptovat se novému prostředí, což zvyšuje invazivní potenciál druhu (např. Sol and Lefebvre 2000, Sol et al. 2005a). U pěvců byl pozorován také vliv migrace. Druhy s relativně velkým mozkem častěji nepříznivé podmínky překonávají a zůstávají ve své domovině, zatímco druhy s mozkem relativně menším častěji migrují na velké vzdálenosti (Sol et al. 2005b).

Díky teorii mozaikovitého vývoje mozku (Barton a Harvey 2000, Iwaniuk et al. 2004) je jasné, že na různé části mozku působí různé selekční tlaky a omezení. S tímto se vypořádali Clark et al. (2001) kdy rozdělil mozek na 12 různých oblastí. Soubor podílů těchto oblastí na celkové

velikosti mozku poté nazval cerebrotypem. Přestože byl tento název poprvé použit až zde, existují studie, které se o podobný popis pokoušely již dříve (např. Legendre et al., 1994). Důkazy, jež by podporovali existenci cerebrotypů u ptáků přinesl již Burish et al. (2004). Přímo však toto dělení poprvé na ptáky aplikovali až Iwaniuk & Hurd (2005) a popsali 5 základních cerebrotypů. První typ najdeme především u hrabavých a měkkozobích ptáků, a je definován relativně velkým mozkovým kmenem. Další typ najdeme u druhů, které mají relativně velké cerebellum, ale malé nidopallium. Třetí cerebrotyp společný sovám a lelkounu sovímu (*Podargus strigoides*) je charakteristický obrovským Wulstem (přesněji hyperpalliem). U papoušků a pěvců pak najdeme čtvrtý typ, pro který jsou typické velké nidopalliální a mesopalliální oblasti a striatopallidální komplex. A konečně typ pátý, který nevyniká velikostí žádné specifické části a je tedy klasifikován jako mozek univerzální. Najdeme ho především u dravců a vodního ptactva. Na první pohled je zřejmé, že toto členění neodráží fylogenetické vztahy. Popisuje spíše behaviorální a ekologickou podobnost druhů, jako jsou způsob pohybu, lov kořisti a kognitivní schopnosti.

Tyto práce přinesly mnoho nových informací a ve své inovativnosti pomohly změnit způsob, jakým dnes ptáky vnímáme. Všechny však používají relativní velikost mozku a to je, jak už bylo doloženo výše, značně zkreslující. Absolutní velikost mozku lze k popisu kognitivních funkcí použít daleko lépe než velikost relativní. Hlavním důvodem pro toto tvrzení však zůstává předpoklad, že stejně jako u savců (Herculano- Houzel 2011b), i u ptáků se budou uplatňovat u různých taxonů různá pravidla škálování.

1.8. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je (1) s použitím metody izotropické frakční homogenizace analyzovat absolutní počty neuronů a nonneuronálních buněk u vybraných druhů pěvců, měkkozobých a vrubozobých, (2) na základě těchto dat stanovit základní pravidla buněčného škálování pro mozky pěvců a (3) porovnat zjištěné s již prostudovanými poměry u savců.

2. Materiál a metodika

2.1. Materiál

V této studii bylo zpracováno 10 ptačích druhů. Předmětem vlastní analýzy bylo 8 zástupců pěvců (Passeriformes) a jako referenční druh byl zahrnut zástupce měkkozobích (Columbiformes) a hrabavých (Galliformes). Tyto druhy byly zvoleny na základě lišících se hmotností mozku a těla. Bylo také přihlédnuto k případnému využívání druhu jako biologického modelu. Od každého druhu byli zpracováni 2 jedinci: havran polní (*Corvus frugilegus*; samec a samice), krkavec velký (*Corvus corax*; samec a samice), sýkora koňadra (*Parus major*; samec a samice), straka obecná (*Pica pica*; samec a samice), pěnice černohlavá (*Sylvia atricapilla*; samec a samice), špaček obecný (*Sturnus vulgaris*; 2 samci), kos černý (*Turdus merula*; 2 samci), zebřička pestrá (*Taenipygia gutta*ta; samec a samice), kur bankivský (*Gallus gallus*; samec a samice), holub (*Columba livia*; samec, pohlaví druhého kusu není známo). Pro analýzu byly, pokud byla možnost výběru, zvoleny kusy opačného pohlaví.

Zvířata pocházela z odchytů ve volné přírodě, případně ze zájmových chovů (kur bankivský, zebřička, krkavec velký).

2.2. Příprava materiálu

Pokusná zvířata byla usmrcena předávkováním inhalačním anestetikem halotanem (Sigma-Aldrich). Halotan (2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan) známý také pod názvem fluothane je doporučován pro snadnou manipulaci, rychlost a vysokou účinnost (Baumans et al. 1997). Velmi vítaný byl také jeho vasodilatační účinek (Close et al. 1996). Po usmrcení byla zvířata perfundována pufrovaným fyziologickým roztokem (dále jen PBS), jednalo se o fosfátový pufr (dále jen PB) s chloridem sodným o koncentraci 0.137 M a pH 7,4, do něhož bylo přidáno 0,1 % heparinu. Následovala perfuze 4% roztokem paraformaldehydu (dále jen PFA)

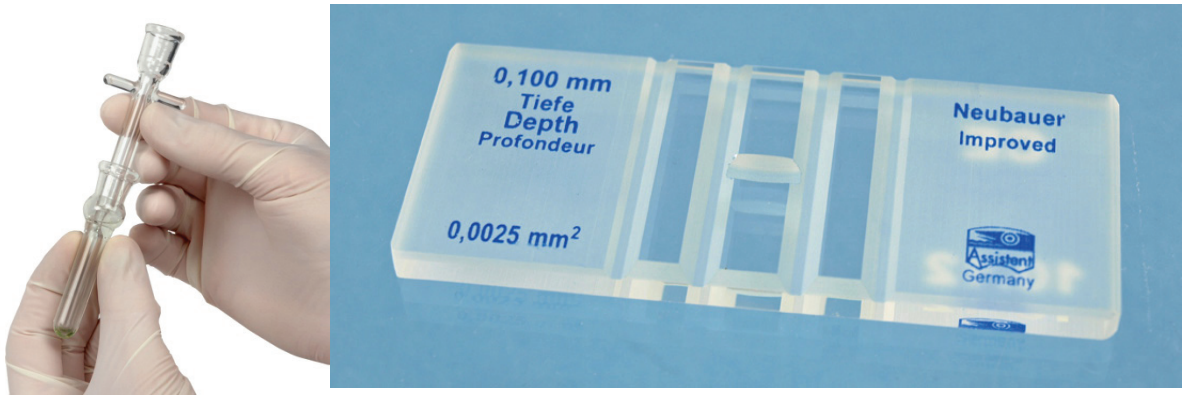
v roztoku PB o koncentraci 0,1M a pH 7,4. Po odebrání základních metrických údajů (délka těla, křídla a běháku) byla zvířata dekapitována a mozek byl vypreparován. Bezprostředně po vyjmutí byl mozek zvážen, aby nedošlo k ovlivnění hmotnosti fixací (viz např. Quester & Schröder 1997). Z kadáveru byla následně vyjmuta mícha a bylo ověřeno pohlaví zvířete. Také mícha byla změřena a zvážena v co nejkratším čase. Následně byly mozky a míchy postfixovány ve stejném fixačním roztoku po dobu 2 týdnů. Po uplynutí doby postfixace byl každý mozek rozdělen na několik anatomicky snadno definovaných částí: telencephalon (každá z hemisfér separátně), diencephalon, tectum opticum, cerebellum a mozkový kmen (viz Obr. 4).

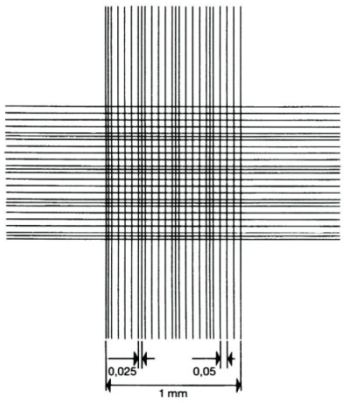
Obr. 4 Mozek krkavce rozdělený na jednotlivé části. Zleva doprava: v horní řadě pravá a levá hemisféra, ve středu diencephalon, mozkový kmen, tectum opticum, úplně dole cerebellum. Foto: S. Olkowicz

Pokud nemohli být mozek či mícha zpracovány okamžitě, bylo použito uskladnění materiálu v nemrznoucí směsi při -25°C. Nemrznoucí směs se skládala z 30 % glycerolu (propan-1,2,3-triol) a 30 % ethylenglykolu (ethano-1,2-diol) v 0,024 M roztoku fosfátového pufru. Před umístěním do nemrznoucí směsi byly mozky několik dní (podle velikosti 3-5 dní) uloženy v 30% roztoku sacharózy, aby se předešlo případnému poškození nízkou teplotou (roztok sacharózy vytěsní vodu obsaženou v tkáni).

2.3. Kvantifikace počtu mozkových buněk

Pro zjištění počtu neuronů a ostatních buněk v mozkové tkáni jsme použili metodu izotropické frakční homogenizace (Isotropic Fractionator), kterou vyvinuli Suzana Herculano-Houzel a Roberto Lent (2005). Jak již bylo uvedeno, tato metoda je založena na přeměně vysoce anisotropické struktury mozku na homogenní isotropickou suspenzi volných jader buněk, které jsou následně fluorescenčně značeny a počítány. Jako marker neuronů byla využita monoklonární protilátka Anti-NeuN. Tato protilátka specificky reaguje s proteinem NeuN, který je produktem genu Fox-3 (Kim et al. 2009). NeuN je protein specifický pouze pro buněčná jádra neuronů. Přesto je v současnosti známo několik neuronálních populací, které tímto markrem nejsou rozeznávány (Mullen et all. 1992, Weyer & Schilling 2003). Jedná se převážně o malé populace buněk v mozečku, jako jsou Purkyněho buňky, košíčkové a hvězdicovité interneurony.





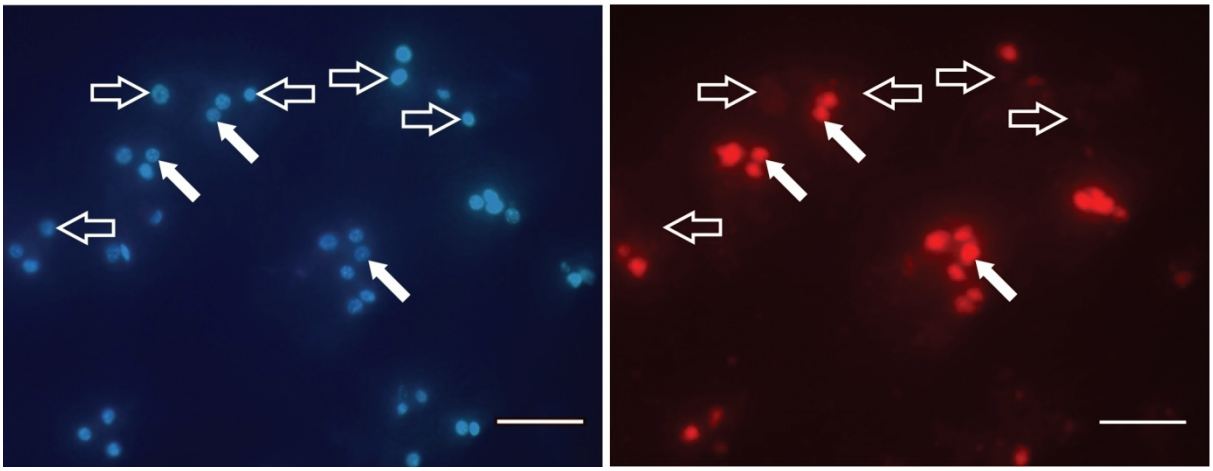
Obr. 5 Pracovní nástroje. Homogenizátor (A), Neubauerova počítací komůrka (B) a detail mřížky sloužící k definování přesného objemu suspenze (C).

Foto: informační materiály výrobců

Zvolená část mozku byla nejprve na Petriho misce rozkrájena na kousky o velikosti asi 1 mm^3. Ty poté byly zhomogenizovány pomocí homogenizátoru Tenbroeck Tissue Grinder (Wheaton Science Products) o odpovídajícím objemu (viz Obr. 5A). V průběhu vlastní homogenizace byl pravidelně přidáván disociační roztok, aby bylo zamezeno ulpívání kousků tkáně příp. buněk na stěnách homogenizátoru. Jako disociační roztok byl použit 40 mM roztok citrátu sodného s přidáním 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Homogenizace byla ukončena ve chvíli, kdy v roztoku nebyly pozorovatelné žádné kousky tkáně. Homogenát byl pomocí pipety přemístěn do odměrného válce a homogenizátor byl opakovaně omyt. Tato suspenze byla přepipetována k homogenátu. Přidáním PBS pak bylo dosaženo požadovaného objemu. Tato výsledná suspenze byla přemístěna z odměrného válce do připravené nádoby vhodné k centrifugaci. Následovala vizualizace buněčných jader pomocí 1% roztoku DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidine, Sigma-Aldrich) v PBS. DAPI je fluorescenční marker vážící se na A-T bohaté sekvence DNA. Takto značená jádra mozkových buněk byla poté spočítána pomocí fluorescenčního mikroskopu (OLYMPUS BX 51) při 400 násobném zvětšení. Kvůli zajištění homogenity byla suspenze před odebráním vzorku důkladně promíchána. Pomocí Neubauerovy počítací komůrky (Karl Hecht GmbH & Co KG; viz Obr. 5B) pak byl zjištěn počet buněčných jader ve vzorku. Pokud byly spočteny všechny pole vnitřní mřížky komůrky (viz Obr 5C), jednalo se o objem 0.0001 ml. Tento postup byl opakován nejméně pětkrát, v případě že byla variabilita těchto výsledků větší než 15 %, byla přidána další opakování. Ve většině případů bylo dosaženo variability nižší než 10 %, v polovině případů pak byla variabilita nižší než 7 %. Jednoduchým vynásobením celkového objemu suspenze a počtu buněčných jader v definovaném objemu byl následně stanoven celkový počet buněk ve zhomogenizované části mozku. Poté bylo přistoupeno ke stanovení počtu neuronů. Po opětovném promíchání suspenze byl odebrán vzorek o objemu maximálně 500 µl. Tento vzorek byl centrifugován, bylo přidáno PBS a pelet byl protřepáním, příp. propipetováním opět resuspendován. Toto bylo opakováno třikrát. Poté byl vzorek inkubován přes noc v primární protilátce Anti-NeuN (MerckMillipore) o koncentraci 1:800 v PBS, s přidáním 5% kozího séra. Následně byl vzorek opět třikrát promyt v PBS. Dalším krokem byla inkubace v sekundární protilátce Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Life Technologies Corp.). Jednalo se o koncentraci protilátky 1:400 v PBS s přidáním 10% roztoku DAPI. Poté byl vzorek opět třikrát promyt. Následně byla suspenze přenesena na sklíčko a byl kvantifikován

počet neuronů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Aby nedošlo k chybné interpretaci signálu imunoflorescence, byla jádra neuronu nejprve identifikována pomocí DAPI (viz Obr 6). U každého takto rozpoznaného buněčného jádra bylo poté vyhodnocováno, zda emituje i signál ve spektru odpovídajícímu zvolené sekundární protilátce. Takto bylo v každém vzorku přezkoumáno nejméně 500 buněčných jader. Výsledné procentuální zastoupení poté sloužilo k výpočtu celkového počtu neuronů. Počet nonneuronálních buněk, jedná se především o astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a ependymální buňky, byl vypočten jako rozdíl mezi počtem všech jader a počtem jader neuronů.

Homogenát, který nebyl využit při pokusu, je skladován pro další využití v nemrznoucí směsi, použité při skladování mozkové a míšní tkáně.



Obr. 6 Suspenze fluorescenčně značených jader. Část homogenátu obarvena DAPI (A) a NeuN (B). Plnými šipkami jsou označeny jádra neuronů, prázdnými jádra nonneuronálních buněk.

Foto: M. Kocourek

2.4. Statistická analýza dat

Všechna data byla zpracována pomocí programu JMP (SAS Institute Inc.). Pro analýzu byly použity průměrné hodnoty pro druh. Průkaznost závislosti mezi proměnnými byla testována s použitím Spearmanova koeficientu pořadové korelace. Jako hladina významnosti byla ve všech případech stanovena p = 0,05. Pokud jí bylo dosaženo, bylo přistoupeno k regresní analýze, která byla provedena metodou nejmenších čtverců. Rovnice regresních přímek jsou uvedeny v logaritmickém tvaru o základu *e* (Eulerovo číslo). Jedná se tedy o tzv. přirozené logaritmy.

3. Výsledky

Veškerá kvantitativní data získaná během této studie jsou shrnuta v tabulce č. 1.

Tab. 1 Přehled kvantitativních znaků studovaných druhů

	Zebřička pestrá	Sýkora koňadra	Pěnice černohlavá	Špaček obecný	Kos černý
Počet kusů [n]	2	2	2	2	2
Hmotnost těla [g]	16,47 ± 1,83	16,98 ± 0,10	17,07 ± 0,77	72,77 ± 3,13	87,22 ± 9,15
Hmotnost mozku [g]	0,49 ± 0,05	0,94 ± 0,10	0,77 ± 0,05	1,86 ± 0,07	1,88 ± 0,17
# neuronů	133,89 ± 8,66 x 10^6	236,27 ± 54,34 x 10^6	155,48 ± 26,57 x 10^6	428,88 ± 54,25 x 10^6	366,20 ± 55,70 x 10^6
# nonneuronálních buněk	60,63 ± 3,02 x 10^6	127,18 ± 29,19 x 10^6	82,22 ± 8,32 x 10^6	261,38 ± 18,33 x 10^6	233,05 ± 30,93 x 10^6
Telencephalon [g]	0,33 ± 0,04	0,67 ± 0,07	0,51 ± 0,05	1,28 ± 0,01	1,27 ± 0,17
-# neuronů	66,04 ± 2,15 x 10^6	98,04 ± 37,50 x 10^6	57,07 ± 59,91 x 10^6	217,85 ± 25,24 x 10^6	160,94 ± 16,70 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	29,45 ± 1,09 x 10^6	66,05 ± 24,28 x 10^6	38,78 ± 3,62 x 10^6	151,04 ± 10,46 x 10^6	109,73 ± 21,72 x 10^6
Diencephalon [g]	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02
-# neuronů	2,32 ± 0,39 x 10^6	2,90 ± 0,02 x 10^6	3,09 ± 0,31 x 10^6	2,68 ± 0,53 x 10^6	2,91 ± 0,01 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	5,24 ± 1,05 x 10^6	12,24 ± 0,27 x 10^6	9,62 ± 1,02 x 10^6	22,98 ± 2,82 x 10^6	24,57 ± 0,37 x 10^6
Tecti optici [g]	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01
-# neuronů	10,52 ± 0,66 x 10^6	15,90 ± 1,07 x 10^6	14,50 ± 2,55 x 10^6	25,47 ± 0,75 x 10^6	26,89 ± 3,70 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	7,29 ± 1,35 x 10^6	10,84 ± 0,38 x 10^6	10,41 ± 0,68 x 10^6	25,53 ± 0,54 x 10^6	33,02 ± 2,68 x 10^6
Cerebellum [g]	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,02
-# neuronů	53,35 ± 11,40 x 10^6	118,39 ± 15,61 x 10^6	79,24 ± 17,53 x 10^6	180,80 ± 27,94 x 10^6	173,29 ± 35,04 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	10,66 ± 3,51 x 10^6	28,79 ± 3,35 x 10^6	15,17 ± 2,64 x 10^6	42,26 ± 6,34 x 10^6	45,92 ± 6,84 x 10^6
Mozkový kmen [g]	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
-# neuronů	1,66 ± 0,31 x 10^6	1,04 ± 0,13 x 10^6	1,56 ± 0,19 x 10^6	2,07 ± 0,21 x 10^6	2,17 ± 0,26 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	7,99 ± 1,26 x 10^6	9,27 ± 0,91 x 10^6	8,25 ± 0,41 x 10^6	19,57 ± 1,83 x 10^6	19,81 ± 0,05 x 10^6

	Straka obecná	Havran polní	Krkavec velký	Holub	Kur bankivský
Počet kusů [n]	2	2	2	2	2
Hmotnost těla [g]	176,61 ± 15,52	433 ± 49,50	1081 ± 100,41	344,5	857 ± 151,32
Hmotnost mozku [g]	5,25 ± 0,75	8,37 ± 0,44	14,25 ± 0,61	2,10 ± 0,18	2,70 ± 0,06
# neuronů	871,84 ± 45,62 x 10^6	1 473,32 ± 15,49 x 10^6	2 133,19 ± 33,16 x 10^6	302,50 ± 7,46 x 10^6	203,98 ± 12,78 x 10^6
# nonneuronálních buněk	580,62 ± 21,57 x 10^6	944,52 ± 1,98 x 10^6	290,67 ± 238,67 x 10^6	276,19 ± 18,88 x 10^6	267,98 ± 20,02 x 10^6
Telencephalon [g]	4,03 ± 0,62	6,65 ± 0,01	11,34 ± 0,63	1,13 ± 0,10	1,48 ± 0,10
-# neuronů	483,50 ± 22,98 x 10^6	896,18 ± 40,02 x 10^6	1 337,36 ± 35,91 x 10^6	72,97 ± 11,93 x 10^6	83,69 ± 17,54 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	336,62 ± 13,05 x 10^6	619,82 ± 4,95 x 10^6	829,47 ± 194,13 x 10^6	116,38 ± 9,46 x 10^6	119,86 ± 2,52 x 10^6
Diencephalon [g]	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,62 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,01
-# neuronů	6,63 ± 0,35 x 10^6	4,73 ± 0,61 x 10^6	8,36 ± 0,28 x 10^6	3,53 ± 1,53 x 10^6	3,67 ± 0,28 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	54,17 ± 2,13 x 10^6	57,03 ± 6,75 x 10^6	103,59 ± 16,89 x 10^6	35,10 ± 1,81 x 10^6	35,66 ± 0,70 x 10^6
Tecti optici [g]	0,31 ± 0,04	0,43 ± 0,02	0,61 ± 0,10	0,26 ± 0,04	0,34 ± 0,03
-# neuronů	41,57 ± 2,82 x 10^6	49,41 ± 0,93 x 10^6	50,20 ± 4,14 x 10^6	23,23 ± 1,92 x 10^6	23,85 ± 2,25 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	65,87 ± 4,87 x 10^6	79,03 ± 10,89 x 10^6	117,85 ± 28,46 x 10^6	38,95 ± 2,87 x 10^6	44,90 ± 9,96 x 10^6
Cerebellum [g]	0,45 ± 0,05	0,67 ± 0,04	1,19 ± 0,11	0,33 ± ,01	0,36 ± 0,01
-# neuronů	337,21 ± 20,16 x 10^6	518,65 ± 24,76 x 10^6	733,11 ± 73,24 x 10^6	198,98 ± 5,70 x 10^6	89,62 ± 8,09 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	85,85 ± 3,63 x 10^6	125,50 ± 1,92 x 10^6	167,55 ± 5,03 x 10^6	48,68 ± 2,48 x 10^6	25,23 ± 5,64 x 10^6
Mozkový kmen [g]	0,19 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,49 ±0,02	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,01
-# neuronů	2,93 ± 0,01 x 10^6	4,35 ± 0,09 x 10^6	4,16 ± 0,30 x 10^6	3,79 ± 1,62 x 10^6	3,14 ± 0,80 x 10^6
-# nonneuronálních buněk	38,11 ± 2,14 x 10^6	63,15 ± 0,87 x 10^6	72,21 ± 4,23 x 10^6	37,08 ± 2,26 x 10^6	42,33 ± 1,19 x 10^6

Druhy pěvců jsou seřazeny podle rostoucí tělesné hmotnosti; holub a kur bankivský jsou pro srovnání uvedeni na konci tabulky. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka. U holuba je známá hmotnost těla pouze u jednoho kusu.

Tělesná hmotnost se u studovaných druhů pěvců pohybovala mezi 16,5 g u zebřičky (*Taenipygia guttata*) a 1081 g u krkavce (*Corvus corax*), krkavec je tedy téměř 66 krát těžší než zebřička. Mozek zebřičky váží 0,5 g, krkavčí mozek dosahuje hmotnosti téměř 30 krát větší – 14,25 g. Počet neuronů se u studovaných druhů pěvců liší více než 15 krát, mezních hodnot bylo dosaženo opět u zebřičky (133,89 x 10^6) a u krkavce (2 133,19 x 10^6). Počet neuronů u pěvců je tedy velmi vysoký a ukazuje na skutečnost, že stejně jako zbytek těla i pěvčí mozek má velmi efektivní stavbu.

3.1. Škálování hmotnosti mozku a jeho částí

Hmotnost mozku u pěvců signifikantně koreluje s hmotností těla (Spearmanův korelační koeficient r=0,9762, p<0,0001; Obr. 7A); Tato závislost je velmi těsná – vysvětluje > 95 % pozorované variability (r^2 ≈ 0,953). Vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku lze charakterizovat mocninnou funkcí (alometrickou rovnicí):

$$\text{Log (MBr)} = -2{,}486369 + 0{,}7483114 \times \text{Log (MBo)}$$ [1]

kde MBr = hmotnost mozku [g], MBo = hmotnost těla [g]

Škálovací koeficient (směrnice regresní přímky) dosahuje hodnoty ~ 0,75; hmotnost mozku tedy, stejně jako u ostatních živočichů, roste negativně alometricky s hmotností těla.

Jistě není překvapivé, že i velikost jednotlivých částí mozku signifikantně koreluje s velikostí těla: mezimozek – r=1, p<0,0001; tectum opticum – r=0,9762; p<0,0001; mozeček – r=0,9762, p<0,0001; mozkový kmen – r=0,9701, p<0,0001 a koncový mozek – r=0,9524; p=0,0003 (Obr. 7B,C).

[1] Vždy, když je v grafech použito logaritmické vynesení, uvádím zlogaritmovanou verzi mocninné funkce. Jedná se o přirozený logaritmus.

Ve všech případech jsou tyto korelace velmi těsné – vysvětlují více než 90 % pozorované variability ($r^2 > 0,9$), charakterizují je následující mocninné funkce:

Log (MTel) = -2,99864 + 0,7895366 × Log (MBo)

Log (MCer) = -4,527421 + 0,6822034 × Log (MBo)

Log (MDie) = -4,847309 + 0,6291323 × Log (MBo)

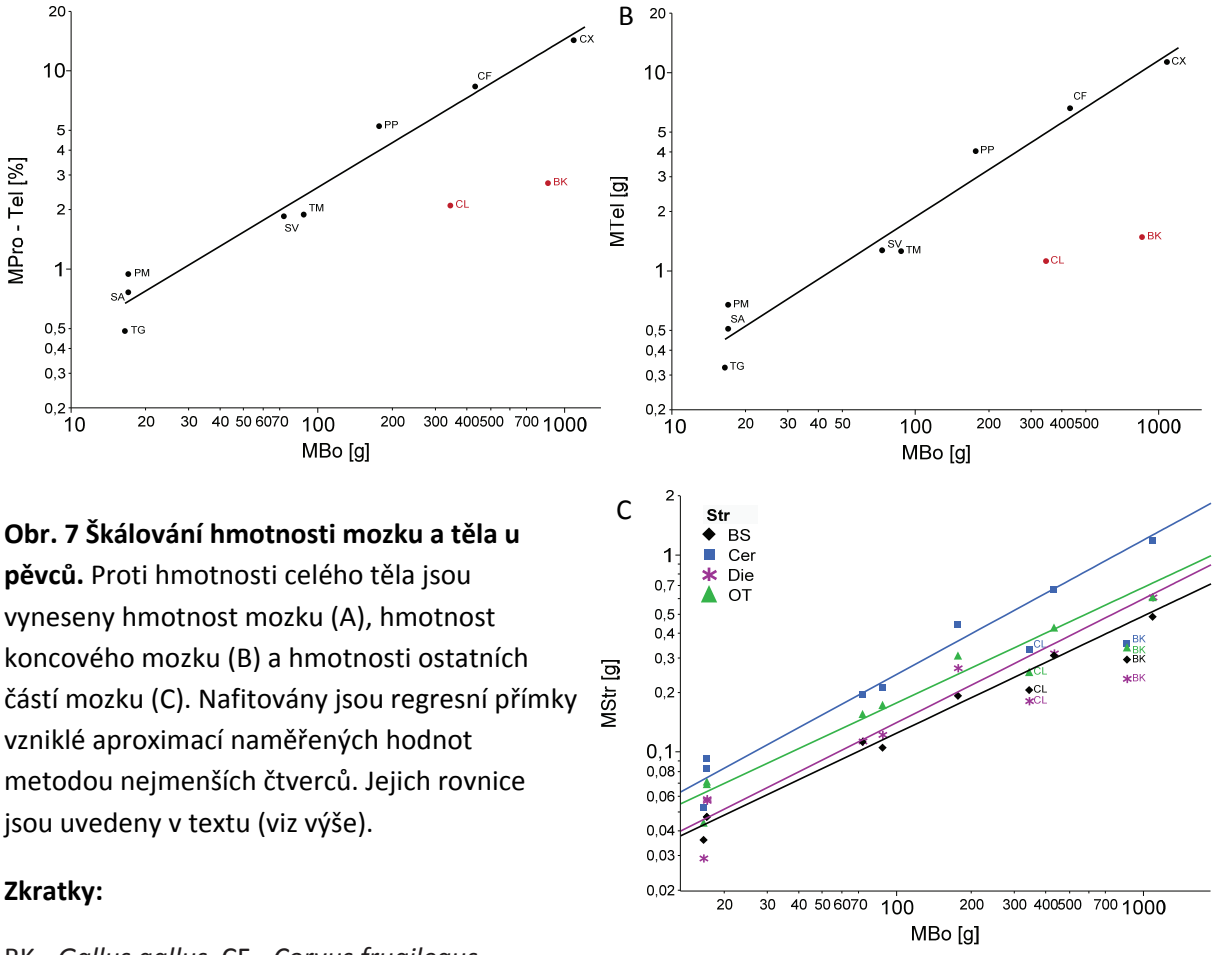
Log (MOT) = -4,419558 + 0,5865277 × Log (MBo)

Log (MBS) = -4,815862 + 0,5955491 × Log (MBo)

kde M* = hmotnost jednotlivých částí mozku [g], MBo = hmotnost těla [g]

Zkratky: Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum

Jak vyplývá z výše uvedených škálovacích koeficientů (směrnic regresních přímek), koncový mozek je jediná část mozku, jejíž hmotnost se s rostoucí hmotností těla zvětšuje výrazněji než hmotnost celého mozku (viz Obr. 7B,C). Všechny ostatní části se zvětšují méně. Je tedy zřejmé, že se u pěvců při zvětšování mozku zvětšuje koncový mozek na úkor ostatních částí mozku.



Obr. 7 Škálování hmotnosti mozku a těla u pěvců. Proti hmotnosti celého těla jsou vyneseny hmotnost mozku (A), hmotnost koncového mozku (B) a hmotnosti ostatních částí mozku (C). Nafitovány jsou regresní přímky vzniklé aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Jejich rovnice jsou uvedeny v textu (viz výše).

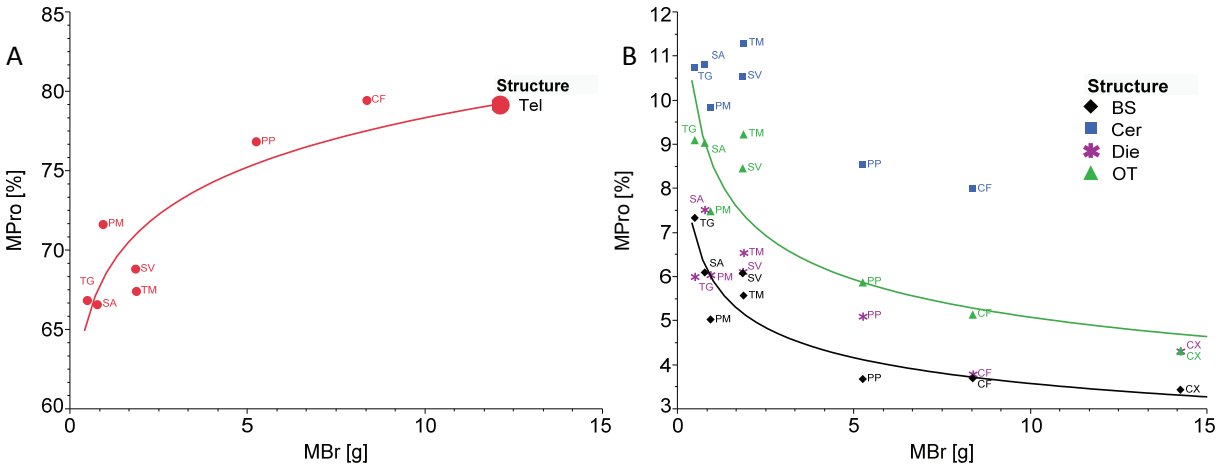
Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CF - *Corvus frugilegus*, CL-*Columba livia*, CX - *Corvus corax*, PM - *Parus major*, PP - *Pica pica*, SA - *Sylvia atricapilla*, SV - *Sturnus vulgaris*, TM - *Turdus merula*, TG - *Taenipygia guttata*

Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum

Tento fenomén je obzvláště dobře patrný, vyneseme-li procentuální hmotnost jednotlivých částí mozku vůči absolutní hmotnosti mozku (Obr. 8). U malých pěvců tvoří koncový mozek okolo 67 % celkové hmotnosti mozku, u krkavce je to téměř 80 % (Obr. 8A). U kura a holuba je pak toto procento výrazně nižší (~39 % u kura, ~48 % u holuba; data nezobrazena). Procentuální přispění ostatních částí mozku k jeho celkové hmotnosti se snižuje (Obr. 8B). Nejvýraznější pokles procentuálního přispění pozorujeme u mozkového kmene, který u zebřičky tvoří 7,3 %, u krkavce pouze 3,4 % hmotnosti mozku. Jak bylo uvedeno výše, mozek krkavce je 66x větší než mozek zebřičky. U mozkového kmene však dojde pouze k dvanáctinásobnému nárůstu hmotnosti (viz Tab. 1). Ačkoli je mozkový kmen u kura a

holuba relativně malý vůči velikosti těla (viz Obr. 7C), tvoří asi 10 % hmotnosti mozku (Tab. 1).



Obr. 8 Procentuální složení mozku v závislosti na hmotnosti mozku. Proti hmotnosti mozku jsou vyneseny procentuální hmotnosti koncového mozku (A) a ostatních částí mozku (B).

Zkratky:

CF - *Corvus frugilegus*, CX - *Corvus corax*, PM - *Parus major*, PP - *Pica pica*, SA - *Sylvia atricapilla*, SV - *Sturnus vulgaris*, TM - *Turdus merula*, TG - *Taenipygia guttata*

Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum

Zatímco procentuální hmotnost koncového mozku vykazuje přímou závislost na absolutní hmotnosti mozku (r=0,8810; p=0,0039, Obr. 8A), procentuální velikost tectum opticum (r=-0,7381; p=0,0366) a mozkového kmene (r=-0,9048; p=0,0020) vykazují závislost nepřímou (Obr. 8B). Mocninné funkce charakterizující tyto závislosti jsou následující:

$$MProTel = 68{,}52947194 \times MBr^{0{,}0582347}$$

$$MProBS = 5{,}91459071 \times MBr^{-0{,}2175859}$$

$$MProOT = 8{,}509535855 \times MBr^{-0{,}223514}$$

kde MPro* = procentuální hmotnost jednotlivých částí mozku [%], MBr = hmotnost mozku [g]

Zkratky: Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, OT – tectum opticum

Korelace mezi hmotností mozku a hmotnostmi mozečku a mezimozku nejsou signifikantní.

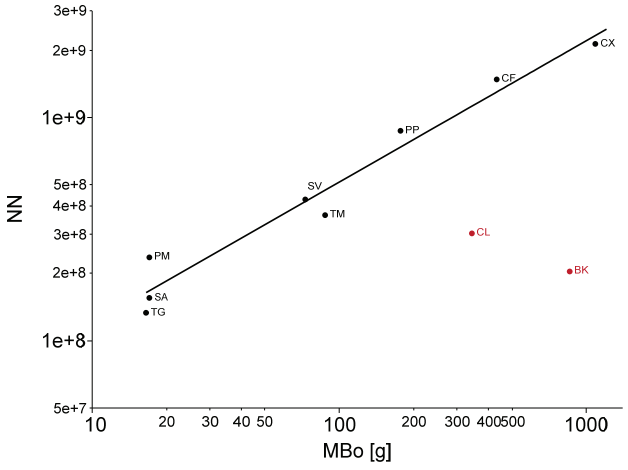
3.2. Škálování počtu neuronů a nonneuronálních buněk

Podobně jako hmotnost mozku, koreluje u pěvců s velikostí těla velmi těsně také celkový počet neuronů (r=0,9524, p=0,0003; Obr. 9); tato závislost vysvětluje > 90 % pozorované variability (r^2 = 0,907). Vztah mezi hmotností těla a hmotností mozku lze charakterizovat mocninnou funkcí:

Log (NN) = 17,146389 + 0,6333618 × Log (MBo)

kde NN = celkový počet neuronů, MBo = hmotnost těla [g]

Počet neuronů u pěvců je překvapivě vysoký. Tento fakt vynikne při porovnání s mozkem kura (*Gallus gallus*). Kur, jehož tělesná hmotnost je jen o 20 % menší než hmotnost krkavce, má relativně malý mozek (2,7 g) a neuronů ~ 10 krát méně než krkavec (203, 98 x 10^6). Dokonce i sýkora koňadra (*Parus major*) vážící pouhých 17 g má více neuronů než kur bankivský (236,27 x 106). Hodnot typických pro pěvce nedosahuje ani holub (*Columba livia*; 302,50 x 106). Například špaček (*Sturnus vulgaris*) vážící ~ 73 g má dvakrát více neuronů než kur bankivský (428,88 x 106) a o ~ 40 % více než holub (*Columba livia*) vážící 344 g. Pěvci tedy nevykazují pouze velkou relativní velikost mozku (tj. stupeň encefalizace, viz Obr. 7A), ale také vysoký relativní počet neuronů (viz. Obr. 9). Tyto výsledky naznačují, že počet neuronů a tudíž hypotetická procesní kapacita vztažená na jednotku tělesné hmotnosti jsou u pěvců výrazně vyšší než u hrabavých a měkkozobých ptáků.



Obr. 9 Škálování počtu neuronů a hmotnosti těla u pěvců. Nafitována je regresní přímka vzniklá aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Její rovnice je uvedena v textu (viz výše).

Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CF - *Corvus frugilegus*,
CL - *Columba livia*, CX - *Corvus corax*,
PM - *Parus major*, PP - *Pica pica*,
SA - *Sylvia atricapilla*, SV - *Sturnus vulgaris*,
TM - *Turdus merula*, TG - *Taenipygia guttata*

Hmotnost mozku velmi těsně koreluje s počtem neuronů v něm obsažených ($r=0,9762$, $p<0,0001$; Obr. 10A); tato závislost vysvětluje > 95 % pozorované variability ($r^2 = 0,953$). Vztah mezi těmito veličinami lze charakterizovat mocninnou funkcí:

$$\text{Log (MBr)} = -22,6088 + 1,1746815 \times \text{Log (NN)}$$

kde MBr = hmotnost mozku [g], NN = celkový počet neuronů

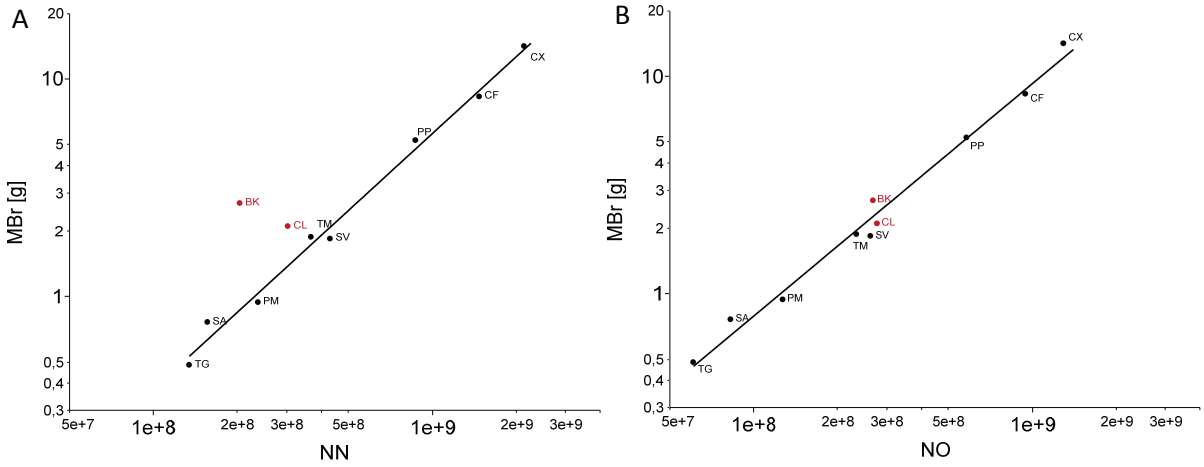
Škálovací koeficient (tj. směrnice regresní přímky) dosahuje hodnoty ~ 1,17; hmotnost mozku tedy roste pozitivně alometricky s počtem neuronů, tj. hmotnost mozku roste rychleji než počet mozkových neuronů. Jinými slovy, druhy pěvců s velkými mozky mají tedy relativně nižší počet a nižší hustotu (viz níže) neuronů. Jak holub (*Columba livia*), tak především kur bankivský (*Gallus gallus*) leží významně nad regresní přímkou pro pěvce (Obr. 10A), tzn. při stejném počtu neuronů je jejich mozek výrazně větší než mozek pěvce.

Obdobně, hmotnost mozku velmi těsně koreluje s počtem nonneuronálních buněk ($r=0,9762$, $p<0,0001$; Obr. 10B); tento vztah charakterizuje mocninná funkce:

$$\text{Log (MBr)} = -19,90656 + 1,0683642 \times \text{Log (NO)}$$

kde MBr = hmotnost mozku [g], NO = celkový počet nonneuronálních buněk

V tomto případě je však škálovací koeficient velmi blízký jedné ($1, 068 \pm 0,04$), tj. jedná se tedy o téměř lineární (izometrickou) závislost. Navíc se ani holub (*Columba livia*) ani kur bankivský (*Gallus gallus*) výrazně neodchylují od regresní přímky popisující tuto závislost u pěvců. Lze tedy spekulovat o možnosti, že podobný izometrický vztah mezi hmotností mozku a počtem nonneuronálních buněk je společný všem ptákům.



Obr. 10 Škálování hmotnosti mozku a počtu mozkových buněk u pěvců.

Hmotnost mozku je vynesena proti počtu neuronů (A) a počtu nonneuronálních buněk (B). Nafitovány jsou regresní přímky vzniklé aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Jejich rovnice jsou uvedeny v textu (viz výše).

Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CF - *Corvus frugilegus*, CL - *Columba livia*, CX - *Corvus corax*, PM - *Parus major*, PP - *Pica pica*, SA - *Sylvia atricapilla*, SV - *Sturnus vulgaris*, TM - *Turdus merula*, TG - *Taenipygia guttata*

Z literatury je známo, že pravidla buněčného škálování jsou specifická pro různé části mozku savců (přehledový článek viz např. Herculano-Houzel 2011b). Proto jsem v dalším kroku přistoupil k analýze škálování počtu buněčných elementů u pěti výše zmíněných částí ptačího mozku (viz metodika). Analyzoval jsem, jak se mění hmotnost dané části mozku v závislosti na počtu neuronů/nonneuronálních buněk obsažených v této části. Jak bylo možné předpokládat, ve všech případech byla hmotnost struktury těsně korelována s počtem neuronů a nonneuronálních buněk v ní obsažených (Obr. 11). Ve všech případech je tato korelace velmi těsná, v několika případech se dokonce limitně blíží funkční závislosti ($r \rightarrow 1$, pak platí $y=f(x)$). Spearmanův korelační koeficient a průkaznost korelace hmotnosti struktury a počtu neuronů v ní obsažených jsou následující: koncový mozek ($r=0,9762$, $p<0,0001$); mozeček ($r=0,9762$; $p<0,0001$); mezimozek ($r=0,8571$; $p=0,0065$); tectum opticum ($r=1$; $p<0,0001$); mozkový kmen ($r=0,8743$; $p=0,0045$). Totéž pro korelaci hmotnosti struktury a počtu nonneuronálních buněk v ní obsažených: koncový mozek ($r=1$; $p<0,0001$);

mozeček (r=1; p<0,0001); mezimozek (r=0,9762; p<0,0001); tectum opticum (r=1; p<0,0001); mozkový kmen (r=0,9701; p<0,0001).

Mocninné funkce charakterizující tyto závislosti jsou následující:

Neurony:

Log (MTel) = -19,97692 + 1,0638647 × Log (NNTel)

Log (MCer) = -24,34616 + 1,196960 × Log (NNCer)

Log (MDie)= -31,8745 + 1,9683134 × Log (NNDie)

Log (MOT) = -28,73811 + 1,5788751 × Log (NNOT)

Log (MBS) = -28,28498 + 1,7853276 × Log (NNBS)

Nonneuronální buňky:

Log (MTel) = -18,66066 + 1,0189501 × Log (NOTel)

Log (MCer) = -20,95791 + 1,1041942 × Log (NOCer)

Log (MDie) = -19,18744 + 1,0078492 × Log (NODie)

Log (MOT) = -17,33555 + 0,9040408 × Log (NOOT)

Log (MBS) = -19,96633 + 1,0544994 × Log (NOBS)

kde M* = hmotnost jednotlivých částí mozku [g], NN* = počet neuronů v jednotlivých částech mozku, NO* = počet nonneuronálních buněk v jednotlivých částech mozku

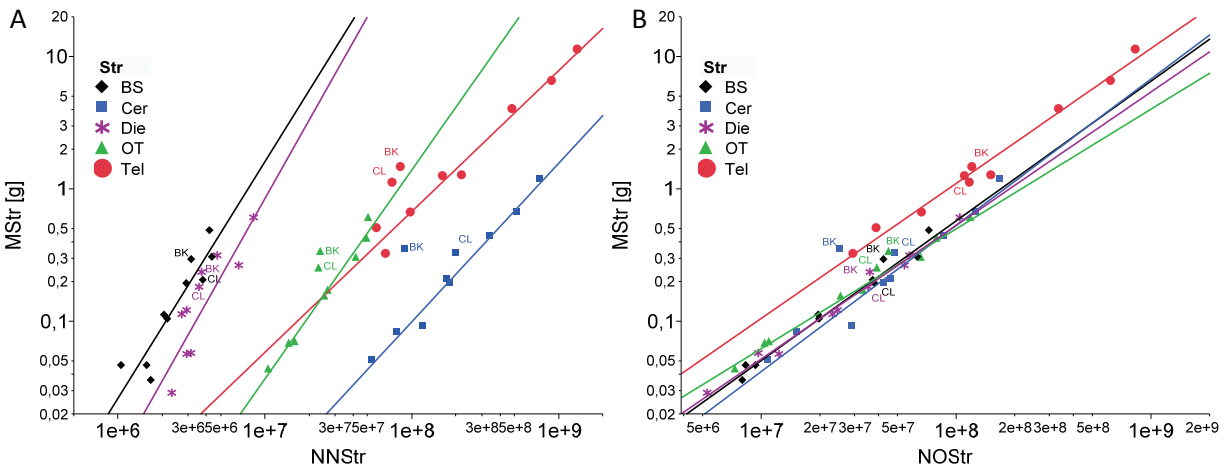
Zkratky: Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum

Jak je patrno z výše uvedených rovnic a z Obrázku 11A, pravidla škálování hmotnosti výše uvedených struktur s počtem neuronů v nich obsažených se výrazně liší; výrazně se odlišují jak škálovací koeficienty (tj. směrnice regresních přímek), tak i průsečíky regresních přímek s osou y (Y-intercept). Zatímco hmotnost mezimozku roste téměř kvadraticky (škálovací koeficient – 1,97±0,39), v případě koncového mozku je závislost téměř lineární/izometrická

(škálovací koeficient – 1,06 ± 0,06; p<0,0001). U ostatních struktur se škálovací koeficient pohybuje mezi těmito extrémy (viz Obr. 11A), přičemž nárůst hmotnosti mozkového kmene a tectum opticum s přibývajícím počtem neuronů je strmější než totéž u mozečku.

V příkrém rozporu s tím, co bylo právě popsáno, se hmotnost všech výše uvedených struktur zvětšuje s nárůstem počtu nonneuronálních buněk téměř izometricky. Škálovací koeficient (tj. směrnice regresních přímek) popisujících tento přírůstek se pohybuje od 0,9 do 1,1 (viz Obr. 11B). Z uniformity vystupuje pouze koncový mozek. Sklon regresní přímky pro koncový mozek je srovnatelný, avšak její posun na ose Y je dobře patrný (viz Obr. 11B). Hmotnost koncového mozku, který bude obsahovat stejný počet nonneuronálních buněk jako kterákoliv jiná část, bude vždy vyšší.

Pozornost si zaslouží fakt, že hmotnost koncového mozku roste téměř lineárně jak s počtem neuronů, tak i s počtem nonneuronálních buněk.



Obr. 11 Škálování hmotnosti mozku a počtu buněk v jednotlivých částech mozku u pěvců.

Hmotnost části mozku byla vynesena proti počtu neuronů (A) a počtu nonneuronálních buněk (B) v této části obsažených. Nafitovány jsou regresní přímky vzniklé aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Jejich rovnice jsou uvedeny v textu (viz výše).

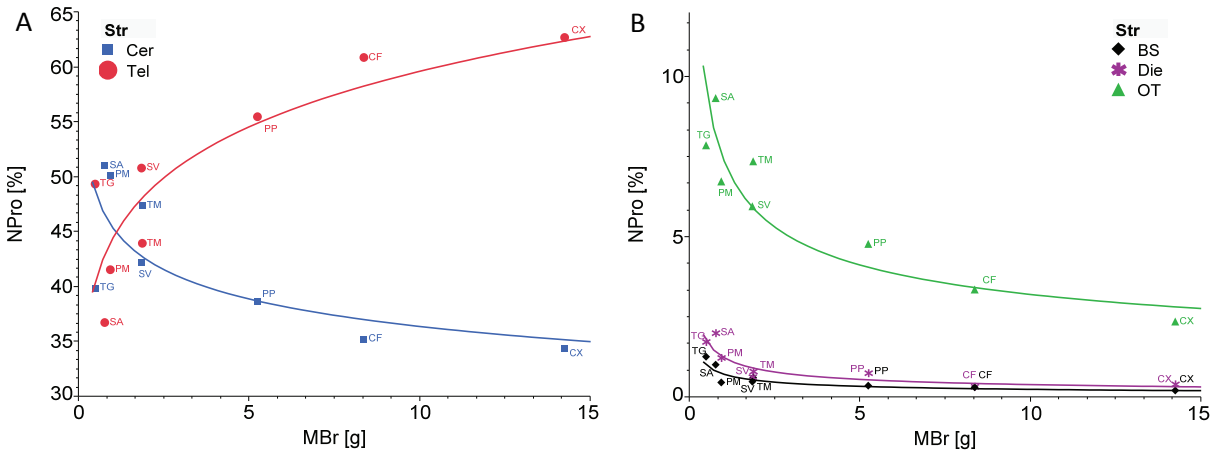
Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CL - *Columba livia*

BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum, Tel – koncový mozek

Vzhledem k tomu, že se u pěvců při zvětšování mozku zvětšuje koncový mozek na úkor ostatních částí mozku (viz Obr. 8), a vzhledem k téměř izometrickému vztahu mezi počtem

neuronů a hmotností koncového mozku (viz Obr. 11), je zřejmé, že se při zvětšování mozku bude u pěvců zvětšovat procentuální podíl neuronů koncového mozku na celkovém počtu neuronů. Procentuální podíl počtu neuronů obsažených v ostatních částech mozku na celkovém počtu neuronů naopak klesá. Tyto závislosti jsou graficky znázorněny na Obrázku 12. Zatímco u malých pěvců tvoří neurony koncového mozku méně než 40 % všech neuronů (např. u pěnice černohlavé 37 %), u krkavce tento podíl tvoří 63 %. Pro srovnání, u kura bankivského tvoří tento podíl 41 %, u holuba dokonce jen 24 %. Nejvýraznější pokles procentuálního přispění k celkovému počtu neuronů pak pozorujeme v mozečku a tectum opticum. Neurony mozečku tvoří u malých pěvců okolo 50 % neuronů, u krkavce pouhých 34 %. Pro srovnání u kura bankivského je to 44 %, u holuba dokonce 66 %! Neurony tectum opticum tvoří okolo 7-9 % u malých pěvců, u krkavce 2 %. U holuba tvoří neurony tectum opticum 8 % a u kura bankivského 11 % z celkového počtu neuronů. Zdá se tedy, že u pěvců tvoří neurony koncového mozku větší procento všech neuronů než u ptáků hrabavých a měkkozobých. U ostatních částí mozku je tomu právě naopak.



Obr. 12 Procentuální rozložení neuronů v závislosti na hmotnosti mozku. Proti hmotnosti mozku jsou vyneseny procentuální podíly neuronů v koncovém mozku a mozečku (A) a v tectum opticum, mezimozku a mozkovém kmeni (B).

Zkratky:

CF - *Corvus frugilegus*, CX - *Corvus corax*, PM - *Parus major*, PP - *Pica pica*, SA - *Sylvia atricapilla*, SV - *Sturnus vulgaris*, TM - *Turdus merula*, TG - *Taenipygia guttata*

Cer – mozeček, Tel – koncový mozek, BS – mozkový kmen, Die – mezimozek, OT – tectum opticum

Zatímco procentuální podíl neuronů koncového mozku vykazuje přímou závislost na absolutní hmotnosti mozku (r=0,8095; p=0,0149; Obr. 12A), procentuální podíly neuronů ostatních částí mozku vykazují závislost nepřímou (Obr. 12A,B): mozeček (r=-0,7381; p=0,0366); mezimozek (r=-0,8810; p=0,0039); tectum opticum (r=-0,9048; p=0,00201); mozkový kmen (r=-0,9048; p=0,0020).

Mocninné funkce charakterizující tyto závislosti jsou následující:

$$NproTel = 44{,}42967935 \times MBr^{0{,}1277454}$$

$$NproCer = 45{,}36942863 \times MBr^{-0{,}0957813}$$

$$NproOT = 7{,}40094874 \times MBr^{-0{,}3631149}$$

$$NproDie = 1{,}23819280 \times MBr^{-0{,}4978414}$$

$$NproBS = 0{,}71758850 \times MBr^{-0{,}4659621}$$

kde NPro* = procentuální podíl počtu neuronů jednotlivých částí mozku [%], MBr = hmotnost mozku [g]

Zkratky: Tel – koncový mozek, Cer – mozeček, OT – tectum opticum, Die - mezimozek, BS – mozkový kmen

3.3. Škálování hustot neuronů a nonneuronálních buněk

Korelace mezi hustotou neuronů a hmotností mozku byla prokázána ve všech částech kromě koncového mozku (viz Obr. 13A). Jak je patrné, tato závislost je vždy nepřímá, se zvyšující se hmotností mozku tedy dochází ke snižování hustoty neuronů; v koncovém mozku se hustota neuronů signifikantně nemění. Signifikantní korelace popisují následující mocninné funkce:

$$\log(DNBS) = 10{,}245821 - 0{,}4144009 \times \log(MBr)$$

$$\log(DNCer) = 13{,}806974 - 0{,}1554758 \times \log(MBr)$$

$$\log(DNOT) = 12{,}206801 - 0{,}2936293 \times \log(MBr)$$

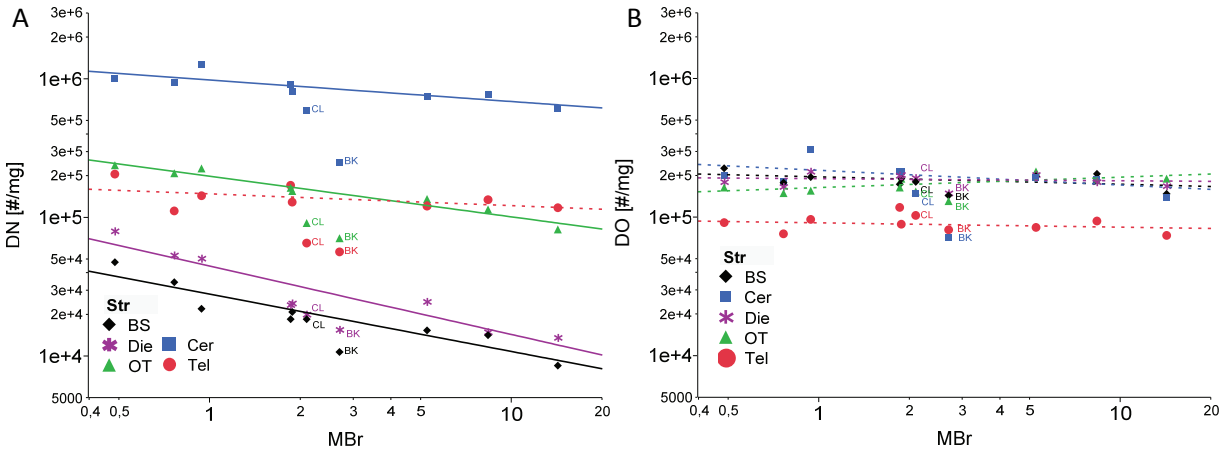
$$\log(DNDie) = 10{,}71181 - 0{,}4939632 \times \log(MBr)$$

kde DN* = hustota neuronů jednotlivých částí mozku [%], MBr = hmotnost mozku [g]

Zkratky: BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, OT – tectum opticum, Die – mezimozek

Hustoty neuronů se výrazně liší mezi jednotlivými mozkovými částmi, nejvyšší hustoty nalézáme v cerebellu (~ 1 × $10^6 mg^{-1}$), výrazně nižší v koncovém mozku a tectum opticum (1-3 × $10^5 mg^{-1}$), nejnižší pak v mezimozku a mozkovém kmeni (<1 × $10^5 mg^{-1}$).

Korelace mezi hustotou nonneuronálních buněk a hmotností jednotlivých částí mozku nebyla prokázána. Hustota nonneuronálních buněk se tedy s rostoucí hmotností mozku signifikantně nemění (viz Obr. 13B). Hustota nonneuronálních buněk je navíc ve všech mozkových částech s výjimkou koncového mozku téměř stejná (~ 2 × $10^5 mg^{-1}$). V koncovém mozku je hustota nonneuronálních buněk přibližně poloviční (~ 1 × $10^5 mg^{-1}$).



Obr. 13 Hustoty buněk v závislosti na hmotnosti mozku.

Proti hmotnosti mozku byla vynesena hustota neuronů (A) a hustota nonneuronálních buněk (B) v jednotlivých částech mozku. Nafitovány jsou regresní přímky vzniklé aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Jejich rovnice jsou uvedeny v textu (viz výše).

Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CL - *Columba livia*

BS – mozkový kmen, Cer – mozeček, Die – mezimozek, OT – tectum opticum, Tel – koncový mozek

3.4. Škálování poměru neuronů a nonneuronálních buněk

V jednotlivých částech se liší poměr mezi neurony a nonneuronálními buňkami (Obr. 14). V mozečku tvoří neurony > 80 % všech buněk, v koncovém mozku ~ 60 %. U ostatních částí mozku hustota signifikantně klesá s rostoucí hmotností mozku: mezimozek (r= - 0.9157; p=0,0014); tectum opticum (r= - 0.9159; p=0,0003); mozkový kmen (r= - 0.9759; p<0,0001). Zvláště dramatický je pokles zastoupení neuronů v tectum opticum. Mocninné funkce charakterizující tyto závislosti jsou následující:

%NeuNBS = 12,91619 - 3,36192 × Log (MBr)

%NeuNOT = 54,68202 - 8,80112 × Log (MBr)

%NeuNDie = 20,26943 - 6,04577 × Log (MBr)

kde %NeuN* = poměr mezi neurony a nonneronálními buňkami jednotlivých částí mozku [%], MBr = hmotnost mozku [g]

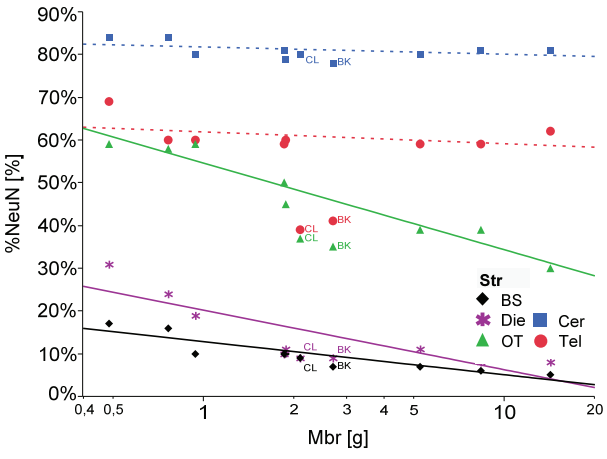
Zkratky: BS – mozkový kmen, OT – tectum opticum, Die - mezimozek

Pozoruhodný je fakt, že zatímco v mozečku a mozkovém kmeni se poměr mezi neurony a nonneuronálními buňkami u holuba a kura bankivského příliš neodlišuje od téhož u pěvců, v případě ostatních struktur, tvoří neurony u těchto druhů menší procento buněčných elementů. Tento rozdíl je nejvýraznější v případě koncového mozku.

Obr. 14 Poměr neuronů a nonneuronálních buněk v závislosti na hmotnosti mozku. Nafitovány jsou regresní přímky vzniklé aproximací naměřených hodnot metodou nejmenších čtverců. Jejich rovnice jsou uvedeny v textu (viz výše).

Zkratky:

BK - *Gallus gallus*, CL - *Columba livia*
BS – mozkový kmen, Die – mezimozek,
OT – tectum opticum,Tel – koncový mozek,
Cer – mozeček



4 Diskuze

4.1. Srovnání pěvců a savců

Výsledky této studie ukazují, že mozek pěvců je vystavěn „prostorově úsporným způsobem“, jeho základní kvantitativní charakteristikou je vysoká hustota neuronů i nonneuronálních buněk. Díky této vlastnosti jsou počty neuronů u velkých druhů srovnatelné s tímtéž u primátů, kteří však mají mozky podstatně větší. Toto pozorování je plně v souladu s nedávnými pracemi, kdy jsou srovnávány kognitivní funkce u ptáků a primátů (viz např. Emery 2004; Emery & Clayton 2004a,b; Lefebvre et al. 2004). Vzhledem k jejich kognitivním schopnostem, sociální inteligenci a schopnosti užívat nástroje jsou pro srovnání nejčastěji používáni krkavcovití ptáci (Hunt 1996, Clayton & Dickinson 1998, více viz Úvod). Krkavcovití však mají ještě jednu výhodu. Najdeme mezi nimi druhy, které, díky velikosti jejich těla a mozku, můžeme přímo srovnávat s primáty a hlodavci. Díky datům jenž poskytuje tato studie, a již dříve publikovaným pracím Suzane Herculano-Houzel a její výzkumné skupiny, tedy můžeme poprvé porovnat výpočetní schopnost mozků těchto druhů pomocí počtu neuronů, a nemusíme se omezovat na zavádějící srovnání hmotnosti či relativní velikosti (encefalizace) mozků nebo jejich částí. Při následujících srovnáních jsou použita data publikovaná v těchto prácích: Herculano-Houzel et al. 2006, Herculano-Houzel et al 2007, Azevedo et al. 2009, Gabi et al. 2010, Herculano-Houzel et al. 2011. Pokud srovnáme počty neuronů u krkavce (*Corvus corax*; váha mozku 14,25 g), mirikiny (*Aotus trivirgatus;* 15,73 g) a agutiho (*Dasyprocta primnolopha*; 17,63 g), najdeme nejvíce neuronů právě u krkavce, více než 2 miliardy, u mirikiny je to již jen jeden a půl miliardy, a aguti disponuje pouze 800 miliony mozkových neuronů. Jeden a půl miliardy neuronů ukrývá také mozek havrana (*Corvus frugilegus*), ten však váží pouze 8 gramů, tzn. jeho hmotnost je ve srovnání s mozkem mirikiny téměř poloviční. Je tedy zřejmé, že absolutní počty neuronů jsou u pěvců významně vyšší než u hlodavců a dokonce i primátů. Tuto skutečnost ilustruje obr. 15, který srovnává závislost velikosti mozku na počtu neuronů u těchto skupin. Mozek pěvce je stavěn výrazně úsporněji než mozek hlodavce, při srovnatelném počtu neuronů tedy bude mít pěvčí mozek vždy nižší hmotnost. To je v souladu s celkovou tělesnou stavbou pěvců (a jiných ptáků), neboť aktivní let tvoří silný selekční tlak na redukci hmotnosti. Zajímavější je srovnání

regresních přímek pro pěvce a primáty. Buněčná architektonika mozku pěvců se opět ukazuje jako úspornější, to však neplatí vždy. Při překročení hranice 138 miliard se architektonika (uspořádání) mozku primátů stává efektivnější. Mozek hypotetického primáta s tímto počtem neuronů by vážil asi 1850 g. Herculano-Houzel (2011b) používá tato pravidla škálování a představuje hypotetický hlodavčí mozek, který by vážil 1,5 kg. Tento mozek by obsahoval asi 12 miliard neuronů. Lidský mozek této hmotnosti obsahuje asi 86 miliard neuronů (Azevedo et al. 2009). Díky pravidlům škálování popsaných v této práci si můžeme obdobně představit hypotetického pěvce, jehož mozek by měl tuto hmotnost. Mozek pěvce vážící 1,5 kg by obsahoval více než 115 miliard neuronů, tzn., o 34% více neuronů než mozek lidský.

Obr. 15 Srovnání škálování hmotnosti mozku a počtu neuronů. Hmotnost mozku je vynesena proti počtu neuronů u hlodavců, pěvců a primátů.

Rovnice regresních přímek:

Hlodavci:

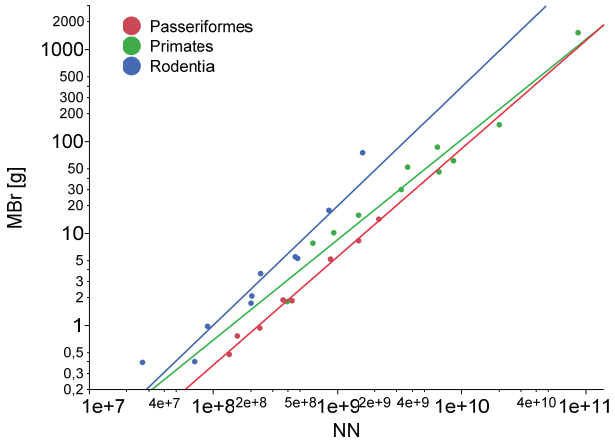
Log (MBr) = -23,81392 + 1,2941967 × Log (NN)

Pěvci:

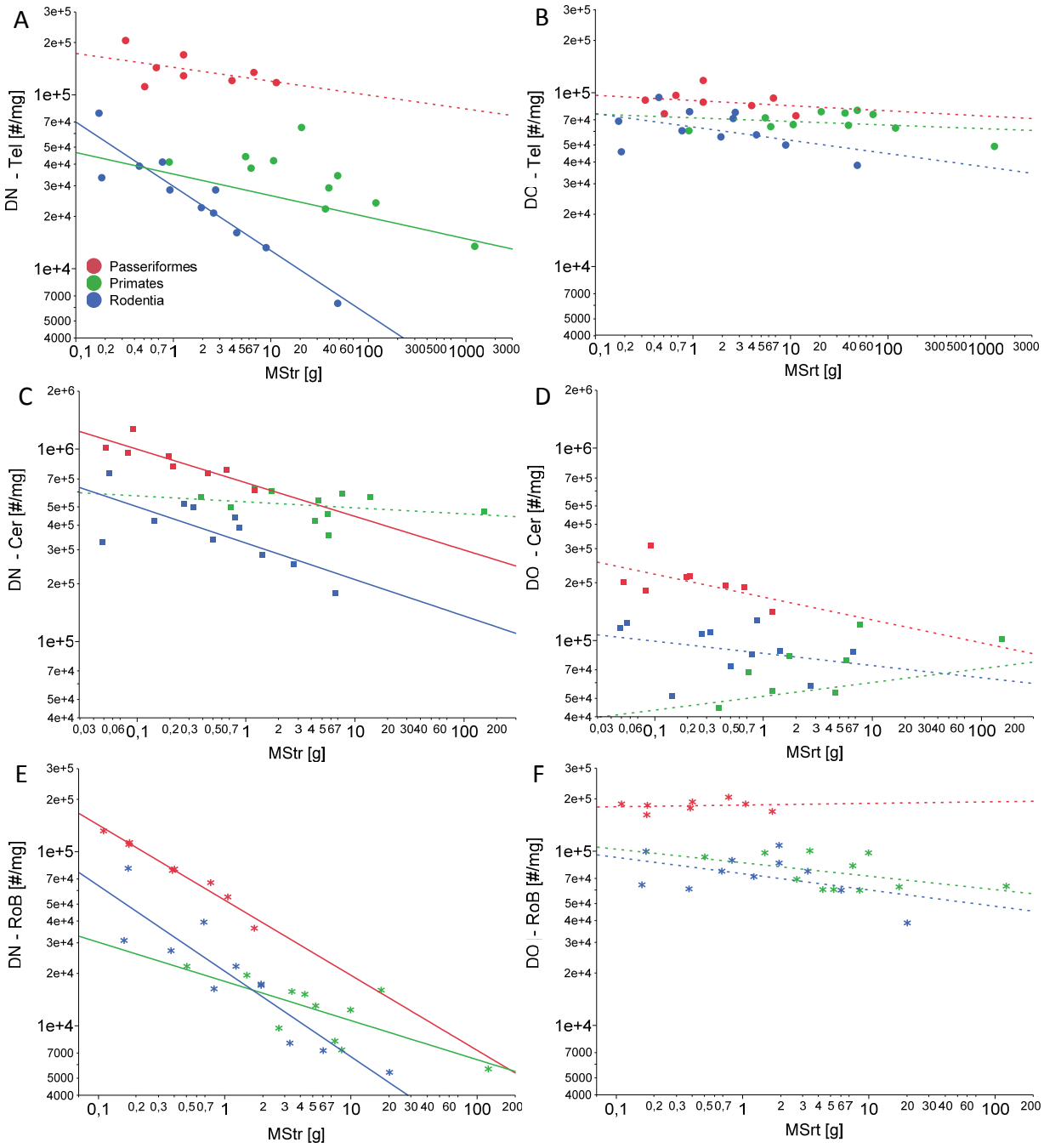
Log (MBr) = -22,6088 + 1,1746815 × Log (NN)

Primáti:

Log (MBr) = -20,38993 + 1,0881691 × Log (NN)

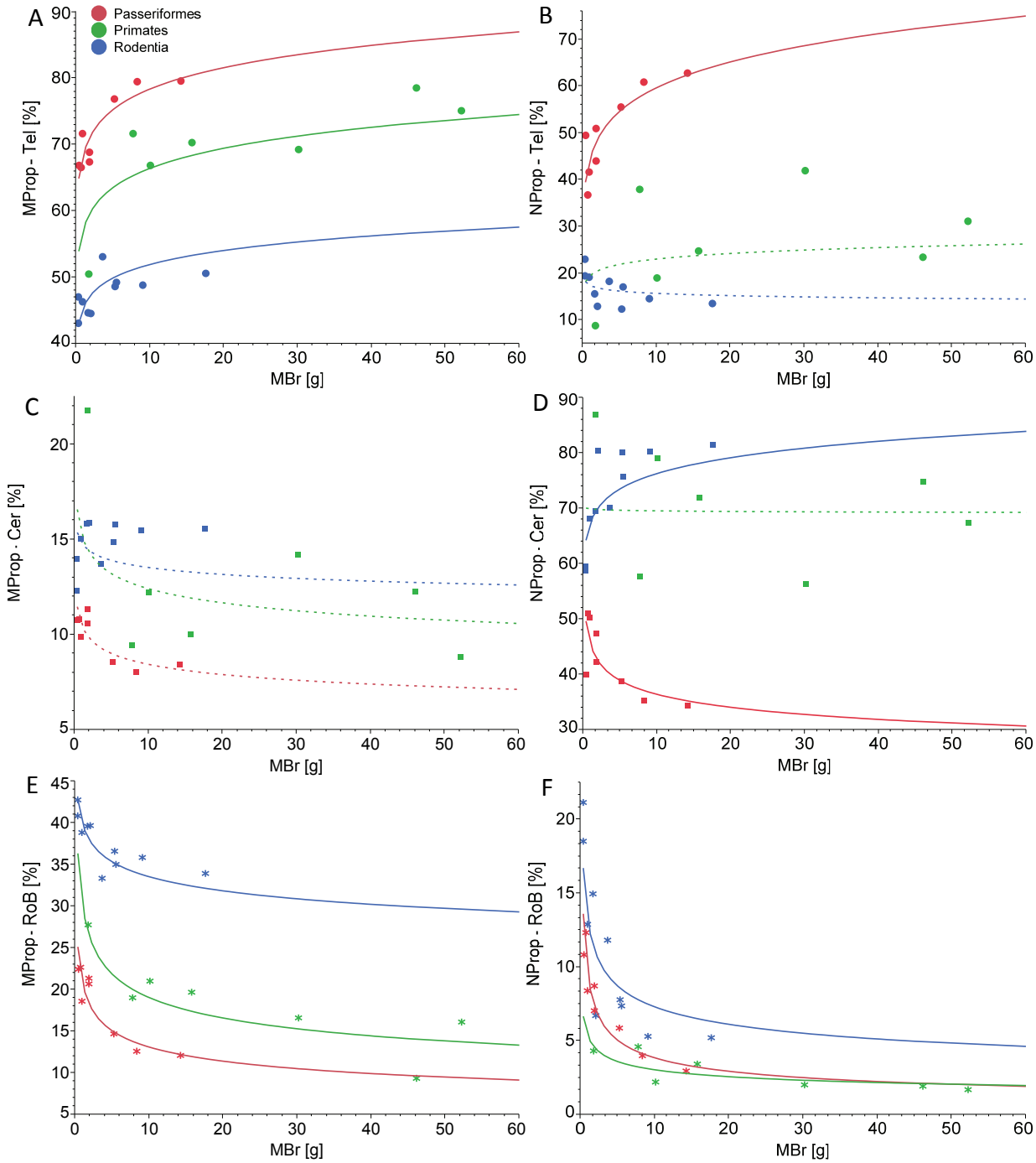


Jeden z důležitých rozdílů ve škálování u pěvců, oproti hlodavcům a primátům, jsou odlišné trendy v hustotě neuronů v jednotlivých částech mozku. U primátů zůstává hustota neuronů přibližně stejná jak v koncovém mozku, tak i v mozečku (Obr. 16A,B). To spolu s faktem, že hmotnost těchto částí se s rostoucím počtem neuronů zvětšuje lineárně, znamená, že průměrná velikost neuronů se u primátů nemění (Herculano-Houzel et al. 2007). U pěvců je hustota neuronů neměnná pouze v koncovém mozku, v mozečku se hustota s jeho velikostí signifikantně zmenšuje (Obr. 16A,B). Jelikož se hmotnost koncového mozku zvětšuje lineárně s počtem neuronů, lze předpokládat, že v koncovém mozku pěvců rovněž nedochází ke zvětšování průměrné velikosti neuronů. Bottjer, Miesnera a Arnold (1986) ve své práci docházejí ke stejným závěrům, kdy se velikost neuronů ve vokálním jádře zebřičky s velikostí



Obr. 16 Hustoty buněk v závislosti na hmotnosti jednotlivých částí mozku. Proti hmotnosti mozku byla vynesena hustota neuronů (A) a hustota nonneuronálních buněk (B) v koncovém mozku; hustota neuronů (C) a hustota nonneuronálních buněk (D) v mozečku; hustota neuronů (E) a hustota nonneuronálních buněk (F) ve zbylých částech mozku.
Zkratky: Cer – mozeček, Tel – koncový mozek, RoB – zbývající části mozku.

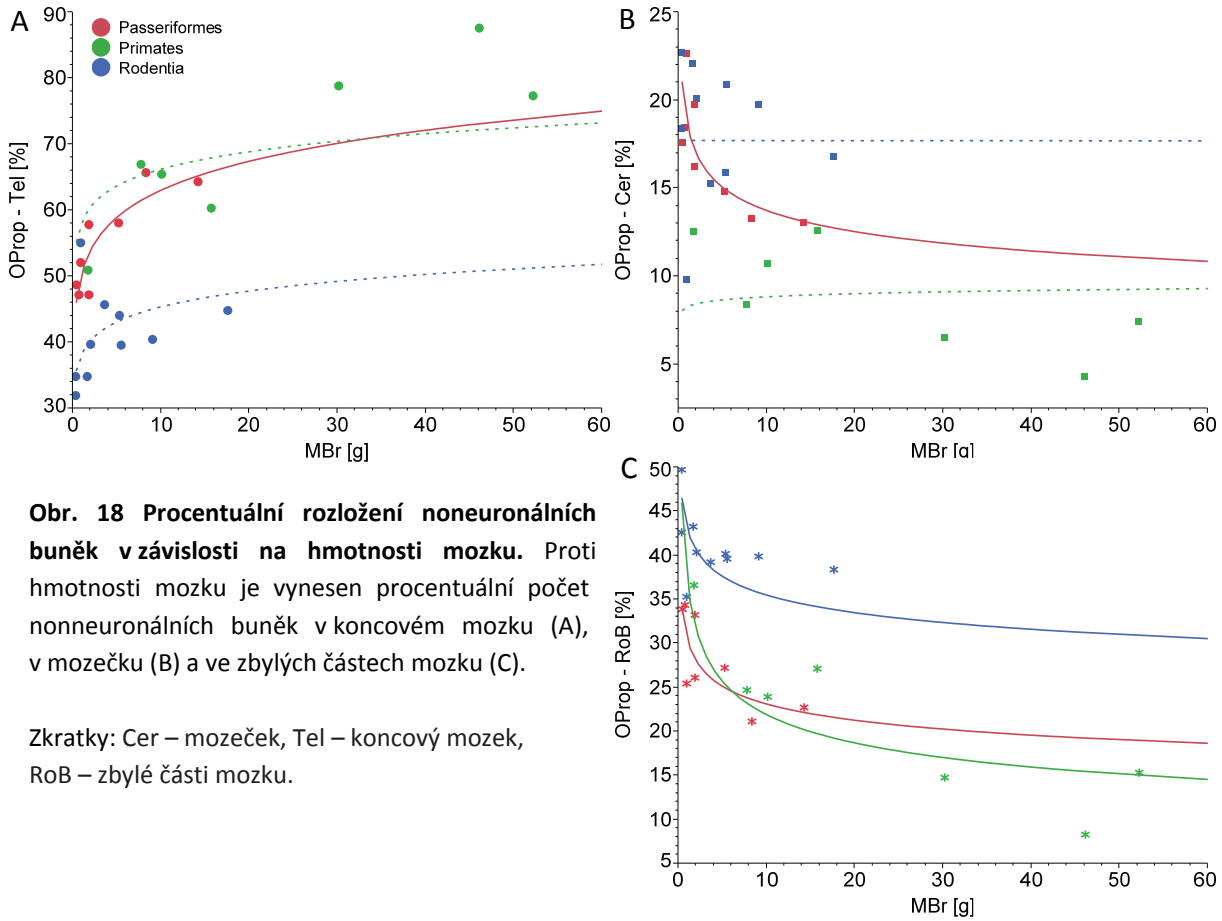
neuronů ve všech částech, a zároveň exponenciální zvětšení hmotnosti těchto částí (Herculano-Houzel et al. 2006). Průměrná velikost neuronů u hlodavců se tedy zvětšuje s rostoucí hmotností mozku ve všech částech. Hustota nonneuronálních buněk u pěvců je vyšší než hustoty buněk u primátů a glires ve všech částech mozku (viz Obr. 16B,D,F). Nicméně, v koncovém mozku je tento rozdíl nejméně patrný (viz Obr. 16B).



Obr. 17 Procentuální rozložení hmotnosti a počtu neuronů v závislosti na hmotnosti mozku. Proti hmotnosti mozku jsou vyneseny procentuální rozložení hmotnosti (A) a počtu neuronů (B) v koncovém mozku; procentuální rozložení hmotnosti (C) a počtu neuronů (D) v mozečku; a procentuální rozložení hmotnosti (E) a počtu neuronů (F) v ostatních částech mozku.
Zkratky: Cer – mozeček, Tel – koncový mozek, RoB – zbylé části mozku

Koncový mozek je jediná část mozku, u které se s rostoucí hmotností mozku zvětšuje svůj podíl na celkové hmotnosti (viz Obr. 17). Toto platí u všech třech skupin obratlovců. Díky této

skutečnosti má koncový mozek rozhodující podíl na hmotnosti celého mozku jak u pěvců, tak i primátů a hlodavců. Tento podíl je však jednoznačně nejvyšší u pěvců (viz Obr. 17A).



Obr. 18 Procentuální rozložení noneuronálních buněk v závislosti na hmotnosti mozku. Proti hmotnosti mozku je vynesen procentuální počet nonneuronálních buněk v koncovém mozku (A), v mozečku (B) a ve zbylých částech mozku (C).

Zkratky: Cer – mozeček, Tel – koncový mozek, RoB – zbylé části mozku.

U krkavce tvoří hmotnost koncového mozku ~ 80 % hmotnosti mozku. U mirikiny je to ~ 70 % a u agutiho dokonce pouze ~ 50 %. Koncový mozek člověka tvoří rovněž 80% hmotnosti mozku, avšak hmotnost lidského mozku je nesrovnatelně větší. Extrapolací z příslušné mocninné funkce (MProTel = 68,519245 × $MBr^{0,050139}$) lze dovodit, že, pokud by existoval pěvec s mozkem o této hmotnosti, více než 98 % z celkové hmotnosti by tvořil právě koncový mozek. Korelace mezi velikostí mozečku a velikostí mozku není signifikantní u žádného z porovnávaných taxonů (viz Obr 17C). Podíl ostatních částí mozku nepřímo koreluje s hmotností celého mozku u pěvců, primátů i hlodavců (viz Obr. 17E). U pěvců je podíl těchto částí na celkové hmotnosti nižší než u primátů a hlodavců.

U primátů a hlodavců najdeme největší podíl neuronů v mozečku (viz Obr. 17D), jejich koncový mozek obsahuje méně než 30% věch neuronů. U pěvců je situace dramaticky odlišná – s výjimkou malých druhů (ale i u nich tvoří neurony ~ 40% všech neuronů) je

většina neuronů obsažena v koncovém mozku (Obr. 17A). U krkavce koncový mozek obsahuje 63 % všech neuronů (pro srovnání u člověka je to jen 19%). Ve zbylých částech mozku vykazuje podíl hmotnosti i podíl počtu neuronů nepřímou závislost na absolutní hmotnosti mozku (Obr. 17E,F). Tento trend je u pěvců, primátů i hlodavců.

Procentuální rozložení nonneuronálních buněk vykazuje u pěvců stejné schéma (viz Obr. 18), jaké bylo pozorováno u procentuálního podílu hmotnosti a procentuálního rozložení počtu neuronů (viz obr 17), a to znamená, že v koncovém mozku se s rostoucí hmotností mozku relativní počet nonneuronálních buněk zvětšuje a v mozečku a v ostatních částech klesá. Největší procento nonneuronálních buněk se vždy nachází v koncovém mozku. U hlodavců a primátů není vztah mezi procentuálním zastoupením nonneurálních buněk a velikostí mozku v koncovém mozku a mozečku signifikantní, ve zbylých částech mozku klesá.

4.2. Možný vliv domestikace a věku na počet neuronů

Použití domestikovaných jedinců či jedinců ze zájmových chovů by mohlo ovlivnit počty neuronů a nonneuronálních buněk u těchto zvířat. Dosud však nebyla publikována žádná studie dokumentující vliv domestikace nebo chovu v zajetí na počet neuronů. V literatuře je však doložen negativní efekt domestikace na velikost mozku (např. Kruska 2005). U ptáků byl efekt domestikace na velikost mozku prokázán u domácích hus (Ebinger & Löhmer 1987), kachen (Ebinger 1995), holubů (Ebinger & Löhmer 1984) i krůt (Ebinger & Röhrs 1995). U krůt bylo pozorováno zmenšení velikosti mozku vlivem domestikace až o 30%. Mechanizmus této změny však dosud nebyl popsán. Můžeme tedy jen spekulovat, zda se jednalo o snížení počtu buněk (ať už neuronů či nonneuronálních buněk), zmenšení velikosti buněčných těl nebo dendritických polí, a nebo zúžení extracelulárního prostoru. Je popsán také vliv bohatosti životního prostředí (tzv. environmental enrichment) na dendritickou arborizaci (Kempermann et al. 1997). Chudé životní prostředí by tedy rovněž mohlo vést ke zmenšení velikosti mozku. U domestikantů byla také pozorována výrazná změna buněčné proliferace a přežívaní při změně v životních podmínkách. U divokých zvířat byly změny nepatrné nebo dokonce nebyly pozorovány vůbec (Schaefers 2012). Zkoumání těchto vlivů však nebylo předmětem mé studie. V této studii byly použity pouze 2 druhy, jenž by mohly být

považovány za domestikanty. Jsou to zebřička pestrá (Taenipygia guttata) a kur bankivský (Gallus gallus). V obou případech se jedná, spíše než o pravé domestikanty, o druhy držené v zajetí pro okrasu a nepředpokládám tedy u nich významnou selekci. Chov v zajetí by, podle Guay & Iwaniuk (2008), měl mít na velikost mozku podstatně menší vliv než domestikace. U vrubozubích byla velikost mozku v zajetí odchovaných jedinců v průměru menší jen o 4,7 % než u volně žijících zvířat. Což je méně, než hranice přesnosti mnou použité metody. Případný vliv domestikace jsem se také snažil snížit volbou jedinců s co nejpůvodnějším fenotypem.

Dalším faktorem, který by mohl ovlivnit počet neuronů a nonneuronálních buněk je věk. Jak ukázali už Goldman a Nottebohm (1983), neurogeneze pokračuje u ptáků i v dospělosti. U dospělých jedinců vzniká většina neuronů v blízkosti komor (ventricular zone, VZ) a migruje do různých jader koncového mozku (Barnea a Pravosudov 2009). Ve vokálním jádře (hyperstriatum ventrale, pars caudalis; HVc) dochází u mláďat k nárůstu počtu neuronů, avšak tento přírůstek se v dospělosti zastaví (Wilbrecht & Kirn 2004). Tomuto odpovídají i závěry studie na myších, kdy byl pozorován výrazný nárůst počtu neuronů v průběhu dospívání (Morterá & Herculano-Houzel 2012). Také u myší se tento trend po dosažení dospělosti zastavuje (asi 2-3 měsíc věku). V dospělosti pak dochází k postupně se zvětšujícímu úbytku a u jedinců, jejichž věk překročil 1 rok, byl tento úbytek velmi výrazný. Věk zvířat použitých v této studii byl většinou neznámý, všichni jedinci však vykazovali adultní fenotyp a rovněž reprodukční orgány byly vždy plně vyvinuty. Do studie nebyl zahrnut žádný jedinec, který by vykazoval očividné známky stáří.

5. Závěr

S použitím metody izotropické frakční homogenizace byly stanoveny počty buněčných elementů u 8 druhů pěvců (Passeriformes) a následně z alometrických vztahů odvozena pravidla buněčného škálování platná pro jejich mozky. Pro srovnání byl do studie zařazen též jeden zástupce řádu hrabavých (Galliformes) – kur bankivský, G*allus gallus* a jeden zástupce měkkozobých (Collumbiformes) – ferální holub, *Columba livia*. Absolutní počty neuronů, jejich hustoty, poměr neurálních a nonneuronálních buněk a pravidla škálování počtu buněčných elementů s velikostí mozku u pěvců byly následně srovnány s tímtéž u primátů a hlodavců. Hlavní výsledky této studie lze shrnout následovně:

1) Hmotnost mozku pěvců roste negativně alometricky s hmotností těla. Škálovací koeficient tohoto vztahu nabývá hodnoty ~ 0,75.
2) Největší procentuální podíl z hmotnosti mozku zaujímá koncový mozek. S rostoucí hmotností mozku se tento podíl ještě zvětšuje, souběžně se zmenšuje procentuální podíl ostatních částí mozku.
3) Hustota neuronů je u pěvců výrazně vyšší než u primátů a hlodavců. Srovnáme-li proto pěvce s hlodavcem či primátem s podobně velkým mozkem, absolutní počet neuronů bude u pěvců vždy výrazně vyšší. Mozek pěvců je tedy vystavěn „prostorově úsporným způsobem“ a pojme podstatně větší počet neuronů než stejně velké mozky savců. Toto uspořádání je klíčovým faktorem umožňujícím komplexní chování a kognitivní schopnosti u těchto ptáků, jejichž tělesná velikost a tedy nutně i absolutní velikost mozku jsou malé.
4) Hmotnost mozku u pěvců se zvětšuje rychleji než počet neuronů. Velké druhy s velkým mozkem mají tedy nižší hustotu neuronů než druhy malé. Pravidla škálování se však liší pro jednotlivé části mozku. Při zvětšujícím se počtu neuronů roste nejvýrazněji mezimozek, nejméně pak koncový mozek. Z toho vyplývá, že s rostoucí hmotností mozku se zvyšuje podíl neuronů, které se nalézají v koncovém mozku.

5) U malých pěvců se nalézá více neuronů v mozečku než v koncovém mozku.
6) S nárůstem počtu nonneuronálních buněk se mozek pěvců zvětšuje téměř izometricky; tento nárůst je velmi podobný ve všech částech mozku. Hustota nonneuronálních buněk je navíc ve všech mozkových částech s výjimkou koncového mozku téměř stejná. V koncovém mozku je hustota nonneuronálních buněk přibližně poloviční. Nicméně i hustoty nonneuronálních buněk jsou u pěvců vyšší než u primátů a hlodavců.

Získaná data tedy potvrzují hypotézu, že u různých skupin obratlovců škáluje buněčné složení mozku s jeho velikostí různě. Velikost mozku proto není možno, v širokých srovnávacích analýzách, používat jako věrohodný indikátor výpočetní kapacity mozku, která je determinujícím faktorem kognitivních schopností.

Seznam použité literatury

Abercrombie, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical Record* 94.2 (1946): 239-247.

Allman, John M., Todd McLaughlin, and Atiya Hakeem. Brain structures and life-span in primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.8 (1993): 3559-3563.

Amiel, Joshua J., Reid Tingley, and Richard Shine. Smart moves: effects of relative brain size on establishment success of invasive amphibians and reptiles. *PLoS One* 6.4 (2011): e18277.

Armstrong, Este. Relative brain size and metabolism in mammals. *Science* 220.4603 (1983): 1302-1304.

Auersperg, A. M. I., I. B. Laumer, and T. Bugnyar. Goffin cockatoos wait for qualitative and quantitative gains but prefer 'better'to 'more'. *Biology letters* 9.3 (2013).

Azevedo, Frederico AC. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology* 513.5 (2009): 532-541.

Azevedo, Frederico AC. et al. Automatic isotropic fractionation for large-scale quantitative cell analysis of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* (2012).

Barnea, Anat, and Vladimir Pravosudov. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *European Journal of Neuroscience* 34.6 (2011): 884-907.

Barton, Robert A., and Paul H. Harvey. Mosaic evolution of brain structure in mammals. *Nature* 405.6790 (2000): 1055-1058.

Baumans, Vera, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory animals* 31 (1997): 1-32.

Beauchamp, Guy, and Esteban Fernández-Juricic. Is there a relationship between forebrain size and group size in birds?. *Evolutionary Ecology Research* 6.6 (2004): 833-842.

Bird, Christopher D., and Nathan J. Emery. Insightful problem solving and creative tool modification by captive nontool-using rooks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.25 (2009a): 10370-10375.

Bottjer, Sarah W., Elizabeth A. Miesner, and Arthur P. Arnold. Changes in neuronal number, density and size account for increases in volume of song-control nuclei during song development in zebra finches. *Neuroscience letters* 67.3 (1986): 263-268.

Bird, Christopher David, and Nathan John Emery. Rooks use stones to raise the water level to reach a floating worm. *Current Biology* 19.16 (2009b): 1410-1414.

Burish, Mark J. et al. Brain architecture and social complexity in modern and ancient birds. *Brain, behavior and evolution* 63.2 (2004): 107-124.

Butler, Ann B., et al. Evolution of the neural basis of consciousness: a bird–mammal comparison. *Bioessays* 27.9 (2005): 923-936.

Clark, Damon A. et al. Scalable architecture in mammalian brains. *Nature* 411.6834 (2001): 189-193.

Clayton, Nicola S., and Anthony Dickinson. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395.6699 (1998): 272-274.

Close, Bryony, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals* 30.4 (1996): 293-316.

Cnotka, Julia, et al. Extraordinary large brains in tool-using New Caledonian crows (*Corvus moneduloides*). *Neuroscience letters* 433.3 (2008): 241-245.

Cockburn, Andrew. Prevalence of different modes of parental care in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273.1592 (2006): 1375-1383.

Collins, Christine E. et al. A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: a comparison of flow cytometry and manual counting methods. *Frontiers in neuroanatomy* 4 (2010).

Cuntz, Hermann. The dendritic density field of a cortical pyramidal cell. *Frontiers in neuroanatomy* 6 (2012).

Darwin, Ch. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. *Murray, London* (1859).

Deaner, Robert O. et al. Overall brain size, and not encephalization quotient, best predicts cognitive ability across non-human primates. *Brain, Behavior and Evolution* 70.2 (2007): 115-124.

Dunbar, Robin IM, and Susanne Shultz. Evolution in the social brain. *Science* 317.5843 (2007): 1344-1347.

Ebinger, P. Domestication and plasticity of brain organization in mallards (Anas platyrhynchos). *Brain, Behavior and Evolution* 45.5 (1995): 286-300.

Ebinger, P., and R. Löhmer. Comparative quantitative investigations on brains of rock doves, domestic and urban pigeons (Columba 1. livia) 1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 22.2 (1984): 136-145.

Ebinger, P., and R. Löhmer. A volumetric comparison of brains between greylag geese (Anser anser L.) and domestic geese. *Journal für Hirnforschung* 28.3 (1987): 291.

Ebinger, P., and M. Röhrs. Volumetric analysis of brain structures, especially of the visual system in wild and domestic turkeys (Meleagris gallopavo). *Journal für Hirnforschung* 36.2 (1995): 219.

Eisenberg, John F., and Don E. Wilson. Relative brain size and feeding strategies in the Chiroptera. *Evolution* (1978): 740-751.

Emery, Nathan J. Cognitive ornithology: the evolution of avian intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361.1465 (2006): 23-43.

Emery, Nathan J., and Nicola S. Clayton. Comparing the complex cognition of birds and primates. *Comparative vertebrate cognition*. Springer US, (2004a). 3-55.

Emery, Nathan J., and Nicola S. Clayton. The mentality of crows: convergent evolution of intelligence in corvids and apes. *science* 306.5703 (2004b): 1903-1907.

Emery, Nathan J. et al. Cognitive adaptations of social bonding in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362.1480 (2007): 489-505.

Fankhauser, G. et al. Effect of size and number of brain cells on learning in larvae of the salamander, Triturus viridescens. *Science* 122.3172 (1955): 692-693.

Fersen, Lorenzo, and Juan D. Delius. Long-term Retention of Many Visual Patterns by Pigeons. *Ethology* 82.2 (1989): 141-155.

Finlay, Barbara L., and Richard B. Darlington. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268.5217 (1995): 1578-1584.

Finlay, Barbara L., Richard B. Darlington, and Nicholas Nicastro. Author's Response: Developmental structure in brain evolution. *Behavioral and Brain Sciences* 24.02 (2001): 298-304.

Gabi, Mariana, et al. Cellular scaling rules for the brains of an extended number of primate species. *Brain, behavior and evolution* 76.1 (2010): 32-44.

Garamszegi, László Zsolt, and Marcel Eens. The evolution of hippocampus volume and brain size in relation to food hoarding in birds. *Ecology Letters* 7.12 (2004): 1216-1224.

Goldman, Steven A., and Fernando Nottebohm. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80.8 (1983): 2390-2394.

Guay, Patrick-Jean, and Andrew N. Iwaniuk. Captive breeding reduces brain volume in waterfowl (Anseriformes). *The Condor* 110.2 (2008): 276-284.

Harvey, Paul H., T. H. Clutton-Brock, and Georgina M. Mace. Brain size and ecology in small mammals and primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77.7 (1980): 4387-4389.

Healy, Susan D., and Candy Rowe. A critique of comparative studies of brain size. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274.1609 (2007): 453-464.

Herculano-Houzel, Suzana. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Frontiers in neuroanatomy* 4 (2010).

Herculano-Houzel, Suzana. Brains matter, bodies maybe not: the case for examining neuron numbers irrespective of body size. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1225.1 (2011a): 191-199.

Herculano-Houzel, Suzana. Not all brains are made the same: new views on brain scaling in evolution. *Brain, behavior and evolution* 78.1 (2011b): 22-36.

Herculano-Houzel, Suzana. The Isotropic Fractionator: A Fast, Reliable Method to Determine Numbers of Cells in the Brain or Other Tissues. *Neuronal Network Analysis*. Humana Press (2012a). 391-403.

Herculano-Houzel, Suzana. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.Supplement 1 (2012b): 10661-10668.

Herculano-Houzel, Suzana. Neuronal scaling rules for primate brains: the primate advantage. v Hofman, Michel A., and Dean Falk. *Evolution of the Primate Brain: From Neuron to Behavior*. Vol. 195. Access Online via Elsevier, (2012c).

Herculano-Houzel, Suzana, and Roberto Lent. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *The Journal of* neuroscience 25.10 (2005): 2518-2521.

Herculano-Houzel, Suzana, and Jon H. Kaas. Gorilla and orangutan brains conform to the primate cellular scaling rules: implications for human evolution. *Brain, behavior and evolution* 77.1 (2011): 33-44.

Herculano-Houzel, Suzana, et al. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.32 (2006): 12138-12143.

Herculano-Houzel, Suzana et al. Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.9 (2007): 3562-3567.

Herculano-Houzel, Suzana, et al. Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs). *Brain, behavior and evolution* 78.4 (2011): 302-314.

Holloway, Ralph L. Within-species brain-body weight variability: A reexamination of the Danish data and other primate species. *American Journal of Physical Anthropology* 53.1 (1980): 109-121.

Huber, Ludwig, and Gyula K. Gajdon. Technical intelligence in animals: the kea model. *Animal cognition* 9.4 (2006): 295-305.

Hunt, Gavin R. Manufacture and use of hook-tools by New Caledonian crows. *Nature* 379.6562 (1996): 249-251.

Hunt, Gavin R., and Russell D. Gray. The crafting of hook tools by wild New Caledonian crows. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271.Suppl 3 (2004): S88-S90.

Isler, Karin, and Carel P. van Schaik. The expensive brain: a framework for explaining evolutionary changes in brain size. *Journal of Human Evolution* 57.4 (2009a): 392-400.

Isler, Karin, and Carel P. Van Schaik. Why are there so few smart mammals (but so many smart birds)?. *Biology Letters* 5.1 (2009b): 125-129.

Iwaniuk, Andrew N., and John E. Nelson. Can endocranial volume be used as an estimate of brain size in birds?. *Canadian Journal of Zoology* 80.1 (2002): 16-23.

Iwaniuk, Andrew N., and John E. Nelson. Developmental differences are correlated with relative brain size in birds: a comparative analysis. *Canadian Journal of Zoology* 81.12 (2003): 1913-1928.

Iwaniuk, Andrew N., and Peter L. Hurd. The evolution of cerebrotypes in birds. *Brain, Behavior and Evolution* 65.4 (2005): 215-230.

Iwaniuk, Andrew N. et al. A mosaic pattern characterizes the evolution of the avian brain. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271.Suppl 4 (2004): S148-S151.

Jarvis, Erich D. Evolution of the pallium in birds and reptiles. *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. 1390-1400.

Jarvis, Erich D., et al. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Reviews Neuroscience* 6.2 (2005): 151-159.

Jerison, Harry. Evolution of the Brain and Intelligence. *Elsevier*, (1973).

Jerison, Harry J., and H. B. Barlow. Animal Intelligence as Encephalization [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 308.1135 (1985): 21-35.

Kempermann, Gerd, H. Georg Kuhn, and Fred H. Gage. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386.6624 (1997): 493-495.

Kim, Kee K. et al. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of Biological Chemistry* 284.45 (2009): 31052-31061.

Kirsch, Janina A., et al. Insight without cortex: lessons from the avian brain. *Consciousness and cognition* 17.2 (2008): 475-483.

Konigsmark, Bruce W. Methods for the counting of neurons. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. Springer Berlin Heidelberg, (1970). 315-340.

Kretschmann, H-J., and F. Wingert. Biometrische Analyse der Volumina des Striatum einer ontogenetischen Reihe von Albinomäusen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 128.2 (1969): 85-108.

Kruska, Dieter CT. On the evolutionary significance of encephalization in some eutherian mammals: effects of adaptive radiation, domestication, and feralization. *Brain, Behavior and Evolution* 65.2 (2005): 73-108.

Lande, Russell. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* (1979): 402-416.

Lange, W. Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell and Tissue Research* 157.1 (1975): 115-124.

Lanza, Robert P., James Starr, and B. F. Skinner. “Lying” in the pigeon. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 38.2 (1982): 201-203.

Lefebvre, Louis, et al. Feeding innovations and forebrain size in birds. *Animal Behaviour* 53.3 (1997): 549-560.

Lefebvre, Louis, et al. Brains, innovations and evolution in birds and primates. *Brain, Behavior and Evolution* 63.4 (2004): 233-246.

Lefebvre, L. et al. Innovating Innovation Rate and Its Relationship with Brains, Ecology and General Intelligence. *Brain, behavior and evolution* 81.3 (2013): 143-145.

Legendre, Pierre, et al. Modeling brain evolution from behavior: a permutational regression approach. *Evolution* (1994): 1487-1499.

Lorenz, Konrad Z. The comparative method in studying innate behavior patterns. (1950).

Mace, Georgina M., Paul H. Harvey, and T. H. Clutton-Brock. Is brain size an ecological variable?. *Trends in Neurosciences* 3.8 (1980): 193-196.

Maklakov, Alexei A. et al. Brains and the city: big-brained passerine birds succeed in urban environments. *Biology letters* 7.5 (2011): 730-732.

Mann, M. D., A. L. Towe, and S. E. Glickman. Relationship between brain size and body size among Myomorph rodents. *Soc. Neurosci Abs* 12 (1986): 111.

Martin, Robert D. Relative brain size and basal metabolic rate in terrestrial vertebrates. *Nature* 293.5827 (1981): 57-60.

Martin, Robert D. Human brain evolution in an ecological context (James Arthur lecture on the evolution of the human brain, no. 52, 1982). (1983).

McCulloch, Warren S., and Walter Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *The Bulletin of Mathematical Biophysics* 5.4 (1943): 115-133.

Mink, Jonathan W., Robert J. Blumenschine, and David B. Adams. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 241.3 (1981): R203-R212.

Mlikovsky, J. Brain size in birds: 1. Tinamiformes through Ciconiiformes. *Vestn. Cesk. Spol. Zool* 53 (1989a): 33-47.

Mlıkovský, J. Brain size in birds: 2. Falconiformes through Gaviiformes. *Vestn. Cesk. Spol. Zool* 53 (1989b): 200-213.

Mlikovsky, J. Brain size in birds: 3. Columbiformes through Piciformes. *Vestn. Cesk. Spol. Zool* 53 (1989c): 252-264.

Mlikovsky, J. Brain size in birds: 4. Passeriformes. *Vestn. Cesk. Spol. Zool* 54 (1990): 27-37.

Mlikovsky, J. Brain size and forearmen magnum area in crows and allies (Aves: Corvidae). *Vestn. Cesk. Spol. Zool* 67.1-4 (2003): 203-211.

Morterá, Priscilla, and Suzana Herculano-Houzel. Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. *Frontiers in neuroanatomy* 6 (2012).

Mullen, Richard J. et al. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116.1 (1992): 201-211.

Navarrete, Ana, et al. Energetics and the evolution of human brain size. *Nature* 480.7375 (2011): 91-93.

Nealen, Paul M., and Robert E. Ricklefs. Early diversification of the avian brain: body relationship. *Journal of Zoology* 253.3 (2001): 391-404.

Nieuwenhuyis, Rudolf, Hendrik Jan ten Donkelaar, and Charles Nicholson. *The Central Nervous System of Vertebrates: With Posters*. Vol. 1. Springer, 1998.

Pakkenberg, Bente, and Hans Jørgen G. Gundersen. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *Journal of Comparative Neurology* 384.2 (1997): 312-320.

Pakkenberg, Henning. The number of nerve cells in the cerebral cortex of man. *Journal of Comparative Neurology* 128.1 (1966): 17-19.

Pepperberg, Irene M. In search of king Solomon's ring: cognitive and communicative studies of Grey parrots (Psittacus erithacus). *Brain, Behavior and Evolution* 59.1-2 (2002): 54-67.

Pepperberg, Irene M., and Jesse D. Gordon. Number comprehension by a grey parrot (Psittacus erithacus), including a zero-like concept. *Journal of Comparative Psychology* 119.2 (2005): 197.

Pepperberg, Irene M., and Mildred S. Funk. Object permanence in four species of psittacine birds: An African Grey parrot (Psittacus erithacus), an Illiger mini macaw (Ara maracana), a parakeet (Melopsittacus undulatus), and a cockatiel (Nymphicus hollandicus). *Animal Learning & Behavior* 18.1 (1990): 97-108.

Pollen, Alexander A. et al. Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain, Behavior and Evolution* 70.1 (2007): 21-39.

Prior, Helmut, et al. Mirror-induced behavior in the magpie (Pica pica): evidence of self-recognition. *PLoS biology* 6.8 (2008): e202.

Quester, Ralf, and Roland Schröder. The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin. *Journal of neuroscience methods* 75.1 (1997): 81-89.

Ramón y Cajal, Santiago. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. (francouzská verze upravena autorem, překlad ze španělštiny L. Azoulay). Maloine, Paris, France. V angličtině 1995 jako Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates (překlad N. Swanson and LW Swanson). (1909,1911).

Ramón y Cajal, Santiago. ?Neuronismo ó Reticularismo? Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las célulasnerviosas. Arch. Neurobiol. Madrid 13, 217–291 and 579–646. V angličtině 1954 jako Neuron theory or reticular theory? Objective evidence of the anatomical unity of nerve cells (překlad M. Ubeda Purkiss and CA Fox). (1954).

Reiner, Anton, et al. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *Journal of Comparative Neurology* 473.3 (2004): 377-414.

Ricklefs, Robert E., and Henry L. Marks. Anatomical response to selection for four-week body mass in Japanese quail. *The Auk* (1985): 323-333.

Roth, Gerhard, and Ursula Dicke. Evolution of the brain and intelligence. *Trends in cognitive sciences* 9.5 (2005): 250-257.

Russell, I. Steele. Brain size and intelligence: a comparative perspective. *Brain, Behavior and Evolution (Oakley, DA and Plotkin, HC, eds)* (1979): 126-153.

Sarko, Diana K., et al. Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in neuroanatomy* 3 (2009).

Seed, Amanda, et al. Intelligence in corvids and apes: a case of convergent evolution?. *Ethology* 115.5 (2009): 401-420.

Schaefers, Andrea TU. Rearing conditions and domestication background determine regulation of hippocampal cell proliferation and survival in adulthood—laboratory CD1 and C57Bl/6 mice versus wild house mice. *Neuroscience* (2012).

Schloegl, Christian, et al. What you see is what you get? Exclusion performances in ravens and keas. *Plos one* 4.8 (2009): e6368.

Sidiropoulou, Kyriaki, et al. Inside the brain of a neuron. *EMBO reports* 7.9 (2006): 886-892.

Smaers, Jeroen B. et al.. Comparative analyses of evolutionary rates reveal different pathways to encephalization in bats, carnivorans, and primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.44 (2012): 18006-18011.

Sol, Daniel, and Louis Lefebvre. Behavioural flexibility predicts invasion success in birds introduced to New Zealand. *Oikos* 90.3 (2000): 599-605.

Sol, Daniel, et al. Big brains, enhanced cognition, and response of birds to novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.15 (2005a): 5460-5465.

Sol, Daniel, et al. Brain size, innovative propensity and migratory behaviour in temperate Palaearctic birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272.1571 (2005b): 1433-1441.

Sol, Daniel, et al.Brain size predicts the success of mammal species introduced into novel environments. *the american naturalist* 172.S1 (2008): S63-S71.

Spencer, Karen A. et al. Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272.1576 (2005): 2037-2043.

Starck, Johannes Matthias, and Robert Eric Ricklefs, eds. *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum*. No. 8. Oxford university press, 1998.

Stephan, H. Vergleichend-anatomische undersuchungen an Insektivorengehirnen. *Cells Tissues Organs* 44.1-2 (1961): 12-59.

Stephan, H. Zur Entwicklungshöhe der Insektivoren nach Merkmalen des Gehirns und die Definition der „Basalen Insektivoren" Zool. Anzeiger (1967) 179:177-199.

Striedter, George F. *Principles of brain evolution*. Sinauer Associates, 2005.

Taylor, Alex H., et al. Spontaneous metatool use by New Caledonian crows. *Current Biology* 17.17 (2007): 1504-1507.

Taylor, A. H., et al. Do New Caledonian crows solve physical problems through causal reasoning?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276.1655 (2009): 247-254.

Tebbich, Sabine, et al. Non-tool-using rooks, Corvus frugilegus, solve the trap-tube problem. *Animal Cognition* 10.2 (2007): 225-231.

Tinbergen, Niko. The study of instinct. (1951).

Thompson, Helen Bradford. The total number of functional cells in the cerebral cortex of man, and the percentage of the total volume of the cortex composed of nerve cell bodies, calculated from Karl Hammarberg's data; together with a comparison of the number of giant cells with the number of pyramidal fibers. *Journal of Comparative Neurology* 9.1 (1899): 113-140.

Tower, Donald B. Structural and functional organization of mammalian cerebral cortex: the correlation of neurone density with brain size. Cortical neurone density in the fin whale (Balaenoptera physalus L.) with a note on the cortical neurone density in the Indian elephant. *Journal of Comparative Neurology* 101.1 (1954): 19-51.

Vernon, Jack A., and John Butsch. Effect of tetraploidy on learning and retention in the salamander. *Science* 125.3256 (1957): 1033-1034.

von Waldeyer-Hartz, Wilhelm. Ueber einige neuere Forschungen im Gebeite der Anatomie des Centralnervensystems. G. Thieme, (1891).

Watanabe, Shigeru, Junko Sakamoto, and Masumi Wakita. PIGEONS'DISCRIMINATION OF PAINTINGS BY MONET AND PICASSO. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 63.2 (1995): 165-174.

West, Mark J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends in neurosciences* 22.2 (1999): 51-61.

Weyer, Anja, and Karl Schilling. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of neuroscience research* 73.3 (2003): 400-409.

Whiting, B. A., and R. A. Barton. The evolution of the cortico-cerebellar complex in primates: anatomical connections predict patterns of correlated evolution. *Journal of human evolution* 44.1 (2003): 3-10.

Wilbrecht, Linda, and John R. Kirn. Neuron addition and loss in the song system: regulation and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1016.1 (2004): 659-683.

Williams, Robert W., and Karl Herrup. The control of neuron number. *Annual review of neuroscience* 11.1 (1988): 423-453.