

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Vojtěch David

Izotropická frakcionace: metoda umožňující spolehlivý odhad procesní kapacity mozku

Isotropic fractionator: a reliable method to assess brain processing capacity

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování

V první řadě tímto děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Němcovi, Ph.D. za vedení během psaní této bakalářské práce. Dále kolegům za konzultace a cenné rady, rodině a přátelům za podporu a všem členům komise za trpělivost při čtení této práce.

Abstrakt

Neurony jsou základními výpočetními jednotkami mozku. Jejich počet je proto považován za nejlepší dostupnou aproximaci mozkové výpočetní kapacity. Recentně objevená pravidla buněčného škálování vedla k překvapivému zjištění, že u různých skupin savců škáluje počet neuronů s velikostí mozku různě. Velikost tedy není možno používat jako spolehlivé měřítko výpočetní kapacity mozku. Cílem této bakalářské práce je shrnout recentní studie využívající metody izotropické frakcionace k počítání gliových buněk a neuronů a interpretace výsledků těchto studií v kontextu evoluce kognitivních schopností u savců a ptáků.

Klíčová slova: velikost mozku, alometrie, počet neuronů, počet gliových buněk, evoluce, srovnávací neuroanatomie, izotropická frakcionace

Abstract

Neurons are the basic computational units of the brain. Their number is therefore believed to be the best available approximation of the brain's computational capacity. The instrumentalization of the isotropic fractionator technique has led to the discovery that starkly different neuronal scaling rules apply to different mammalian orders. Consequently, brain size cannot be used as a reliable measure of brain functional capacity. The aim of this thesis is to summarize recent studies utilizing isotropic fractionator and to interpret results of these studies in terms of evolution of mammalian/avian cognitive abilities.

Key words: brain size, allometry, number of neurons, number of glial cells, evolution, comparative neuroanatomy, isotropic fractionator

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Izotropní frakcionace.....	6
2.1. Historie.....	6
2.2. Princip.....	7
2.3. Postup.....	7
2.4. Automatický homogenizátor.....	10
2.5. Srovnání IF s jinými kvant. metodami.....	11
2.6. Využití IF v klinických studiích.....	12
3. Distribuce buněk.....	12
3.1. Afrotheria.....	12
3.2. Hlodavci (Rodentia).....	13
3.3. Hmyzožravci (Eulipotyphla).....	16
3.4. Primáti (Primata).....	17
3.5. Sudokopytníci (Artiodactyla).....	18
4. Hustota neuronů.....	21
4.1. Afrotheria.....	21
4.2. Hlodavci (Rodentia).....	22
4.3. Hmyzožravci (Eulipotyphla).....	22
4.4. Primáti (Primata).....	23
4.5. Sudokopytníci (Artiodactyla).....	24
5. Škálovací pravidla.....	24
5.1. Afrotheria.....	25
5.2. Hlodavci (Rodentia).....	25
5.3. Hmyzožravci (Eulipotyphla).....	26
5.4. Primáti (Primata).....	26
5.5. Sudokopytníci (Artiodactyla).....	27
5.6. Škálovací pravidla nonneurálních buněk.....	27
6. Srovnání s ostatními obratlovci.....	28
7. Závěr.....	28
8. Přehled použité literatury.....	29

1. Úvod

Pro účely srovnávací neurobiologie a neuroanatomie v určování procesní kapacity či kognice bývá tradičně jako hybná síla považována relativní velikost mozku v poměru s tělesnou hmotností. Ovšem nepanuje shoda jak tuto velikost mozku vyjádřit. Možnostmi jsou například vyjádření indexem encefalizace (Jerison, 1973), nebo jiným způsobem s využitím reziduálů z lineární regrese (např. Clutton-Brock a Harvey, 1980), případně relativní velikost některé části mozku, u savců nejčastěji isocortexu (Dunbar, 1992). Žádná z těchto možností však nebere v potaz vnitřní distribuci mozku na tkáňové i buněčné úrovni. Dnes se polemizuje, zda právě distribuce nervových buněk v strukturách mozkové tkáně nejsou tím pravým signifikantním korelátem kognitivních schopností. V poslední době se ukazuje, že nejdůležitějším ukazatelem procesní kapacity mozku je počet neuronů, nonneurálních buněk a poměr mezi nimi. Dále počet synapsí na jednu buňku, rychlost vedení vzruchu, která je závislá na hustotě neuronů a myelinizaci (Dicke a Roth, 2016).

2. Izotropní frakcionace

Izotropní frakcionace (dále jen IF) je metoda, která umožňuje efektivně (rychle a levně) stanovit počet nervových buněk v celých mozcích a jejich částech. Tato metoda má proto značný potenciál pro využití při studiu kortikálních a subkortikálních změn v počtu nervových i nenervových buněk ve zdravé, poraněné, zestárlé či nemocí postižené mozkové tkáni (Collins a kol., 2010), jakož i při srovnávacím studiu evolučních změn výpočetní kapacity a kognitivních schopností napříč skupinami (Herculano-Houzel a kol. 2014b).

2.1. Historie

IF navrhla Suzana Herculano-Houzel, působící v oddělení srovnávací neuroanatomie na univerzitě v Rio de Janeiro v Brazílii (Universidade Federal do Rio de Janeiro). První publikovaná práce metodiky byla zveřejněna v roce 2005 (Herculano-Houzel a Lent 2005). Jedná se tedy o relativně novou metodu. Avšak i za tak krátkou dobu od jejího vzniku již byla IF použita v mnoha publikovaných článcích. Její význam je potencován drobnými technickými inovacemi, které techniku průběžně vylepšují.

Doposud byly díky IF prozkoumány různé skupiny obratlovců. Zpočátku se metoda aplikovala převážně na savce: primáty, hlodavce, hmyzožravce, afrotheria a sudokopytníky (např. Sarko a kol., 2009; Herculano-Houzel, 2009; Neves a kol., 2014; Kazu a kol., 2014). Postupně se počet kvantifikovaných skupin rozšiřuje. V naší laboratoři (katedra zoologie, Univerzita Karlova) se soustředujeme na ptáky, kteří jak se ukázalo, mají v mozcích zcela odlišné poměry (Olkowicz a kol., v revizi). Ze třídy plazů byl jako jediný druh kvantifikován krokodýl nilský (*Crocodylus niloticus*) (Ngwenya a kol., 2013). Je pouze otázkou času, kdy naroste počet kvantifikovaných skupin.

2.2. Princip

Vychází se z faktu, že každá buňka v těle obratlovců obsahuje právě jedno jádro. Mechanickou homogenizací je narušena cytoplasmatická membrána nervových buněk, ovšem jaderná membrána zůstane, díky početnějšímu zastoupení proteinových komplexů, neporušena. Všechna jádra jsou nejprve obarvena pomocí markeru DNA – DAPI (4',6-diamin-2-fenylindol). Následně jsou v malé objemové frakci imunocytochemicky obarvena jádra neuronů a stanoven jejich poměr vůči počtu non-neuronálních (gliových, ependymových a endotelových) buněk. Toto je princip metody IF (Herculano-Houzel a Lent 2005).

IF určuje absolutní hodnoty neuronů a nonneurálních buněk, ale již nezohledňuje synaptické spoje či myelinizaci neuronů.

2.3. Postup

Metoda zahrnuje více procesů. Jsou to fixace tkáně, homogenizace, imunocytochemické barvení, spočítání celkového počtu buněk a poměru neuronů a vyhodnocení výsledků na základě jednoduchých matematických modelů.

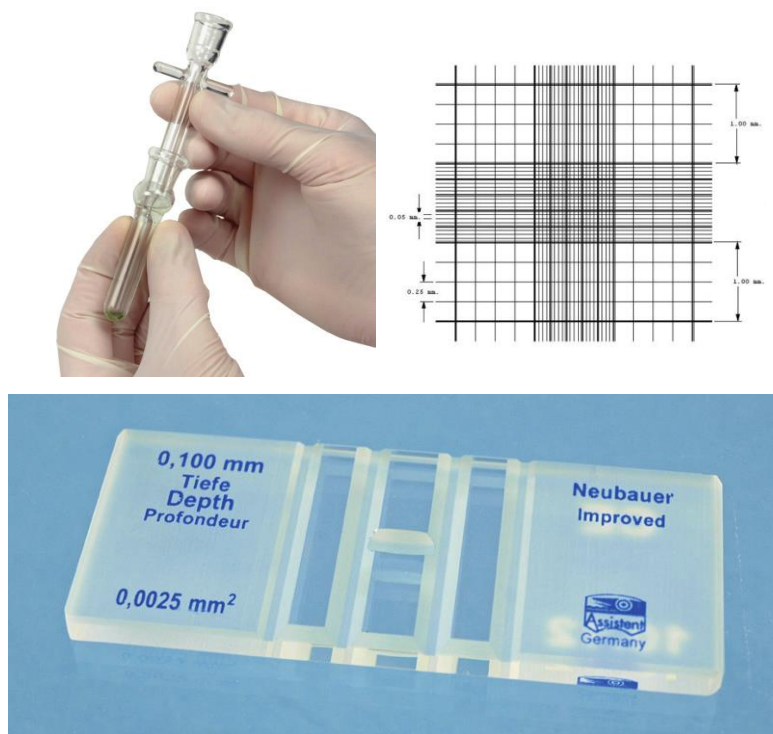
Nejdříve je potřeba mozkovou tkáň fixovat. V případě okamžitého fixování tkáně, ihned po usmrcení experimentálního zvířete je ideálním způsobem perfuzní fixace. Do levé komory srdce zvířete je zavedena kanyla, následně je prořata pravá srdeční předsíň. Nejprve je do krevního řečiště vháněn pufrovaný fyziologický roztok (pH=7.4, dále jen PBS), který je ohřátý na basální teplotu experimentálního zvířete. Ten z těla vyplaví krev. Použití PBS je důležité zvláště u obratlovců, kteří mají červené krvinky obsahující jádro. Pokud by mozková tkáň nebyla erytrocytů zbavena, jejich jádra by mohla být započítána do celkového

počtu buněk mozku a došlo by k nadhodnocení počtu non-neuronálních buněk. K vlastní fixáži je nejčastěji používán 4% roztok paraformaldehydu v PBS (dále jen PFA), který je vpraven do krevního řečiště jako druhý. Dají se ovšem použít i jiná fixační činidla. Po dokončení perfuze je potřeba tkáň po dobu 1-3 týdnů postfixovat.

Může nastat situace, kdy je potřeba kvantifikovat počet buněk v tkáni, která je již delší dobu fixována. Jedná se o případ, kdy je vzorek uchován ve fixáži déle než 6 týdnů. V takovém případě je vzorek třeba řádně připravit. Po této době se ve tkáni hromadí aldehydy, které mají tendenci k autofluorescenci. Za účelem jejich eliminace se vzorek proplachuje v PBS a následně, po přidání 0.2 M kyseliny borité (pH = 9.0), inkubuje v 70° C po dobu 45 minut (Herculano-Houzel, 2011). V tomto případě hrozí ztráta epitopů, proto je ideální kvantifikovat kompletní cílenou tkáň naráz.

Po fixaci je potřeba vyjmout studované tkáně, v našem případě mozek a hřbetní míchu. Po vyjmutí jsou mozek a mícha po dobu 3 – 30 dnů fixovány ve vhodném fixačním činidle, mozek je dále rozdělen do jednotlivých částí. U řady studií zaměřených na buněčné složení savčího mozku byl mozek jednoduše rozdělen na mozkovou kůru, mozeček (cerebellum) a zbytek mozku (například: Herculano-Houzel a kol., 2011; Sarko a kol., 2009; Kazu a kol., 2014; Herculano-Houzel, 2012). V naší laboratoři se při studiu ptačích mozků rutinně používá členění na: pravou a levou hemisféru (cerebrum), tectum opticum, mezimozek (diencephalon), mozeček (cerebellum) a mozkový kmen (truncus encephali). Byly však publikovány i studie, ve kterých byl mozek parcelován výrazně podrobněji (například: Herculano-Houzel a kol., 2013; Collins a kol., 2010; Young a kol., 2013; Cahalane a kol., 2012; Oliveira-Pinto a kol., 2014).

Dalším krokem je z anizotropní struktury měkké tkáně vytvořit homogenní suspenzi jader. Nejčastěji je k tomuto účelu používán manuální, skleněný homogenizátor (dobře se osvědčil například Tenbroeck Tissue Grinder). Ten mechanickým třením naruší strukturu cytoplasmatické membrány buněk, avšak zachová jejich jadernou membránu. Ta je díky většímu počtu transmembránových proteinů odolnější, ovšem i ji lze poškodit. Homogenizace jednoho vzorku by neměla přesáhnout 40 minut, jelikož se vzrůstající dobou zpracování se zvyšuje riziko poškození jader. Homogenizace je dokončena ve chvíli, kdy již nejsou v roztoku okem pozorovatelné části tkáně. Dále je suspenzi potřeba připravit na samotnou kvantifikaci. Přidáním PBS k homogenátu je dosaženo definovaného objemu a následným přidáním roztoku DNA-specifického markeru DAPI v PBS je vzorek připraven na spočítání celkového počtu jader.



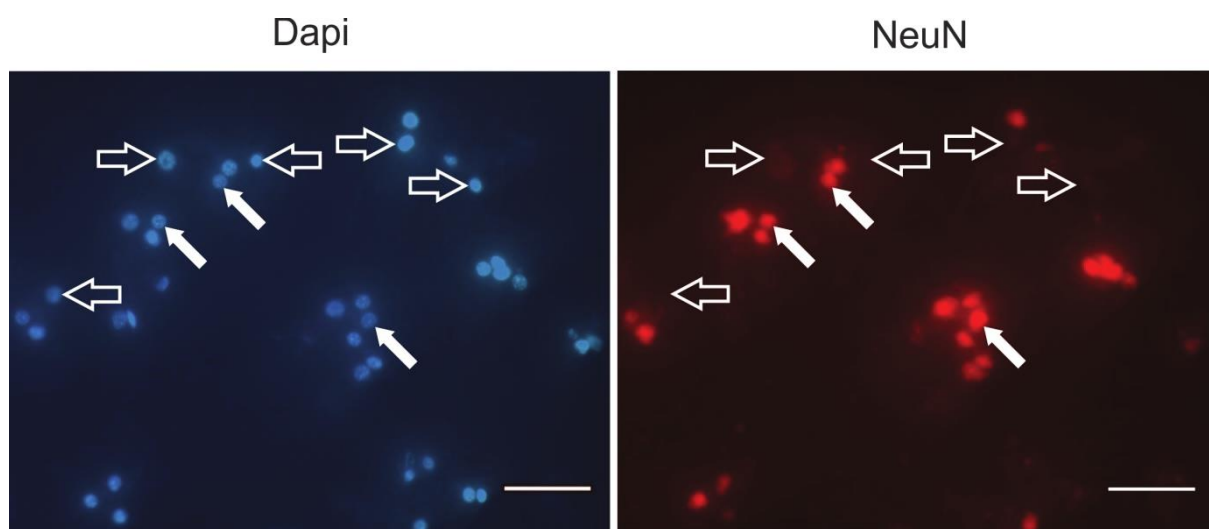
Obr. 1: Manuální homogenizátor, početní mřížka a Neubauerova komůrka.

Foto: Komerční foto výrobců.

Stanovení celkového počtu jader v suspenzi je umožněno díky fluorescenčnímu obarvení pomocí DAPI a následné kvantifikaci pod fluorescenčním mikroskopem. Využívá se početní mřížky, tzv. Neubauerovy komůrky neboli hemocytometru, který se běžně používá ke kvantifikaci krevních buněk.

Po určení celkového počtu jader v suspenzi následuje rozlišení buněk nervových od nenervových (převážně gliových buněk), který je umožněn na základě imunocytochemické detekce NeuN (neuronal nuclear protein). Jedná se o protein, který je specifický pro jaderné membrány naprosté většiny nervových buněk obratlovců. Některé populace nervových buněk tento protein neobsahují, ale tyto populace jsou vůči celku zanedbatelné (Mullen a kol., 1992). Na NeuN je v suspenzi navázána nejdříve primární protilátka proti NeuN. Následuje navázání sekundární, fluorescenčně značené protilátky, proti IgG zvířete, ve kterém byla vyprodukována primární protilátka. K rozpoznání neuronálních a non-neuronálních populací buněk slouží jak navázání protilátek, tak obarvení DAPI. A to na principu, že každé jádro

obarvené DAPI je pozorováno, zda emituje záření ve spektru pro DAPI vlastní a poté je změnou filtru na mikroskopu porovnáno, zda emituje i záření odpovídající fluorochromu konjugovanému se sekundární protilátkou. Takto je potřeba porovnat alespoň 500 jader. Výsledné procentuální zastoupení slouží k určení celkového počtu nervových buněk v určité části mozku. Kvantifikace nervových buněk celého mozku odpovídá součtu počtu nervových buněk v jednotlivých částech mozku.



Obr. 2.: Fluorescenčně značená jádra buněk. Nalevo jádra obarvená DAPI, napravo NeuN. Plné šipky označují jádra neuronů, prázdné jádra nonneurálních buněk.

Foto: M. Kocourek

2.4. Automatický homogenizátor

IF je sama o sobě, co se od fixování tkání až po zpracování výsledků týče, velmi rychlý proces. Její relativně zdlouhavá část je homogenizace, která se povětšinou provádí manuálně. Za účelem zrychlení tohoto procesu byl vytvořen automatizovaný homogenizátor (Azevedo a kol., 2013). Princip je stále stejný, jako u manuální homogenizace, pouze je znásoben počet homogenizátorů, které vytvářejí suspenzi jader. Připojením k motorům automatického přístroje lze docílit vyššího množství zpracovaných vzorků za stejný časový úsek. Přínos automatického homogenizátoru je signifikantní při kvantifikaci buněk objemných mozků (například lidského), či velkého množství méně objemných mozků. Porovnání

výsledků manuální a automatické homogenizace ukázalo, že rozdíl mezi nimi je minimální (Azevedo a kol., 2013).

Existuje rovněž velké množství komerčně dostupných tkáňových homogenizátorů/disociátorů. Ty, které jsou určeny k převodu buněk do tkáňových kultur mohou být, za předpokladu optimalizace disociačního protokolu, rovněž použity pro potřeby IF. Prozatím se ale manuální homogenizace stále jeví jako neúčinnější.

2.5. Srovnání IF s dalšími kvantifikujícími metodami

Se vznikem nové metody jde ruku v ruce její porovnání s dosavadními kvantifikačními metodami, jako je například využití průtokového cytometru či stereologické metody.

Při porovnávání metod, které se specializují na mozkovou tkáň je ideální využít obou hemisfér či stejné oblasti dvou hemisfér stejného jedince, neboť existuje oprávněný předpoklad, že tyto struktury jsou plně srovnatelné. Počet buněk v těchto oblastech/hemisférách by tedy měl být velmi podobný.

Srovnávané metody jsou: IF, průtoková cytometrie a stereologická metoda (optická frakcionace). Každá z těchto metod má své specifické výhody i nevýhody. Pro kvantifikaci nervových buněk využívají všechny metody imunocytochemického značení neuronů pomocí anti-NeuN protilátky.

Nejméně spolehlivá metoda je metoda stereologická (Miller a kol., 2014), která odvozuje prostorovou (3D) představu anatomické struktury na základě plošné (2D) předlohy. I když již od 60. let minulého století byly stereologické metody považovány za standard pro kvantifikaci počtu buněk v biologických tkáních (Glaser a Glaser, 2000), a přes značnou standardizaci a sofistikovanost postupů jsou výsledky kvantifikací pro velké celky (např. celý mozek) stále problematické (viz. např. Azevedo et al. 2009). Nicméně recentní studie prokázala, že jsou výsledky stereologie a IF srovnatelné (Bahney a von Bartheld, 2013).

IF a průtoková cytometrie poskytují velmi podobné výsledky (Collins a kol., 2010). U průtokové cytometrie se liší příprava vzorku. Až po homogenizaci, včetně navázání DAPI a imunocytochemického navázání primární protilátky na jádra v suspenzi je postup totožný s IF. Rozdíl nastává u navázání sekundární protilátky. Průtokový cytometr využívá laserů, díky kterým je možné odrazivostí emitovaných složek světla detekovat specifickou strukturu buněk. Proto je potřeba navázat takovou sekundární protilátku, kterou průtokový cytometr rozpozná a určí populace buněk, které jsou DAPI a NeuN pozitivní. Dále je potřeba vzorky

přefiltrovat a proplachovat v PBS, protože obsahují útržky cytoplazmatických membrán, organel a myelin homogenizovaných buněk. Tyto zbytky buněk by mohly znehodnotit výsledky.

IF je tudíž oproti průtokové cytometrii ve výhodě z důvodu, že není potřeba vzorek upravovat filtrací. Ta zvyšuje počet potřebných přípravných procesů, které navyšují jak čas, tak i riziko znehodnocení vzorků. Naopak nevýhodou, že je potřeba každý vzorek ručně spočítat. Průtokový cytometr kvantifikuje populace buněk automaticky a počítač vyhodnocuje výsledky většího objemu suspenze za kratší čas.

2.6. Využití IF v klinických studiích

IF byla využita k určení změny počtu nervových buněk u jedinců postižených Alzheimerovou nemocí – nejčastější příčinou demence u starších lidí. U touto nemocí postižených jedinců, u kterých se projevují symptomy, se prokázal výrazný pokles neuronů v hipokampu (pokles až poloviny neuronů) a mozkové kůře (pokles o 29 % - 8.38 miliard neuronů v šedé hmotě). Současně u těchto pacientů dochází k navýšení buněk nonneurálních v mozkové kůře (nárůst o 46 % - 28.32 miliard neuronů) a podkorových oblastech (nárůst o 27 % - 44.97 miliard buněk). Ukázalo se, že mozeček není ovlivněn Alzheimerovým onemocněním. A to i navzdory tomu, že obsahuje 77.5 – 79.8 % veškerých neuronů v mozku (Andrade-Morales a kol., 2013).

3. Distribuce buněk

V této kapitole jsou shrnuty výsledky týkající se relativní hmotnosti mozku a jeho částí, relativní i absolutní distribuce buněk a počet buněk. Mezi nejčastěji kvantifikované mozkové struktury patří mozková kůra, mozeček, hipokampus, čichové laloky a zbylé oblasti mozku. Největší z těchto struktur je mozková kůra a dalo by se předpokládat, že bude i obsahovat nejvíce neuronů. Opak je pravdou, jelikož většina neuronů je soustředěna v mnohem menší struktuře - mozečku (souhrný článek viz např. Herculano-Houzel a kol. 2014b).

3.1. Afrotheria

Mezi Afrotheria, která představuje bazální skupinu placentálních savců, patří například

skupiny afrohyzožravci (*Afrosoricida*), bércouni (*Macroscelidea*), damani (*Hyracoidea*) a chobotnatci (*Proboscidea*). Kvantifikované druhy Afrotheria jsou bércoun jihoafrický (*Elephantulus myurus*), bércoun čtyřpřstý (*Petrodromus tetradactylus*), zlatokrt hotentotský (*Amblysomus hottentotus*), daman skalní (*Procavia capensis*), daman pralesní (*Dendrohyrax dorsalis*) a slon africký (*Loxodonta africana*) (Herculano-Houzel a kol., 2014a). Průměrná velikost těla se liší od bércouna jihoafrického – 45 g po damana skalního – 2.5 kg (vyjímaje slona afrického) 55.8krát, velikost mozku 20.8krát a celkový počet neuronů v mozku 9.4krát. Poměr velikosti mozkových struktur s celkovou velikostí mozku je mezidruhově relativně konstantní. Průměrná velikost mozkové kůry včetně hippocampu představuje $53.8 \pm 2.2\%$ (bez hippocampu $45.2 \pm 2.9\%$), mozečku $13.1 \pm 1.1\%$, hippocampu $8.4 \pm 1.2\%$ a ostatních oblastí mozku $32.5 \pm 2.8\%$ celkové velikosti mozku. Mozeček obsahuje $66.2 \pm 3.6\%$, mozková kůra (bez hippocampu) $24.6 \pm 2.0\%$, hippocampus $3.3 \pm 0.6\%$ a ostatní oblasti mozku $10.2 \pm 1.1\%$ všech neuronů v celém mozku (Neves a kol., 2014).

Nejmenší ze zkoumaných druhů bércoun jihoafrický (*Elephantulus myurus*) má zastoupení neuronů v oblastech mozku následující: mozková kůra obsahuje 16.423 ± 0.265 milionů neuronů, mozeček 89.312 ± 2.852 milionů, hipokampus 9.443 ± 4.284 milionů, čichové laloky 9.694 ± 1.745 milionů a zbylé oblasti mozku obsahují 14.012 ± 3258 milionů nervových buněk. Největší z kvantifikovaných druhů této skupiny (vyjma slona afrického) daman skalní (*Procavia capensis*) má nervové zastoupení v mozkové kůře 171.209 ± 35.277 milionů neuronů, v mozečku 488.373 ± 42.322 milionů, hipokampu 26.712 ± 6.216 milionů, čichových lalocích „20.909“ milionů a zbylých oblastech mozku 69.358 ± 0.762 milionů nervových buněk (Neves a kol., 2014). Slon africký se neřídí stejnými škálovacími pravidly jako ostatní zástupci Afrotheria a díky naprosto bezprecedentní dominanci v počtu mozečkových neuronů vybočuje tento druh od všech dosud známých savců. Mozek slona afrického, který byl ke kvantifikaci použit, vážil 4618.6 g a obsahoval 257.0 miliard nervových buněk. Mozková kůra o váze 2848.0 g obsahovala 5.6 miliard neuronů, hippocampus (24.42 g) 36.63 milionů, mozeček (1171.63 g) 250.71 miliard a ostatní oblasti mozku (564.67 g) 0.74 miliard nervových buněk (Herculano-Houzel a kol., 2014a).

3.2. Hlodavci (*Rodentia*)

Jednou ze skupin, u kterých byla IF použita, jsou hlodavci. Mezi zkoumané druhy byly zahrnuty velikostně malé - myš, dále středně velké druhy - potkan, až po největšího hlodavce

- kapybaru.

U myši byly zkoumány funkční oblasti mozku. Konkrétně 18 rozdělených oblastí mozkové kůry. Předpoklad je, že počet neuronů se bude v různých funkčních oblastech lišit. Rozdílná distribuce neuronů dala vzniku rozdělení 2 korových zón – optickou zónu a zónu ostatních oblastí, či ne-optickou. V oblasti optické mají neurony v průměru až 2krát větší hustotu na mm^3 (až 100 000 neuronů/ mm^3) než v ostatních oblastech (Herculano-Houzel a kol., 2013). Kupříkladu v oblasti primární zrakové kůry (V1) je oblast mozkové kůry s největší nervovou hustotou, avšak neobsahuje největší počet neuronů. Většina neuronů v korových oblastech myši se soustředí v primární somatosensorické kůře, která obsahuje 25 % všech korových neuronů. Druhá v pořadí je motorická kůra, která obsahuje 10 % a jako třetí je primární optická kůra s 9 % celkového počtu korových neuronů. Tudíž, všechny primární sensorické oblasti obsahují 62 % všech korových neuronů.

Myš byla srovnávána například s kapybarou, která je mnohonásobně větší jak v celkové tělesné hmotnosti, tak ve velikosti mozku. Srovnávání bylo zaměřeno na porovnání distribuce neuronů v mozkové a mozečkové kůře. Mozková kůra všech zkoumaných druhů hlodavců obsahuje relativně stejné procentuální zastoupení neuronů (17.8 ± 3.4 % celkového počtu neuronů v mozku). Rozdíly jsou u mozečkové kůry. U myši je procentuální zastoupení 59.0 ± 5.0 %, u kapybary 72.4 ± 3.3 % celkového počtu neuronů v mozku (Herculano-Houzel a kol., 2006). Stejně jako byly spočítány populace nervových buněk, tak byly spočítány populace buněk nonneurálních. Mozková kůra, mozeček a ostatní části mozku mají podobnou hustotu nonneurálních buněk i přes různou velikost struktur. To naznačuje, že přibývání nonneurálních buněk dodržuje stejná pravidla a přispívá k velikosti stejně ve všech strukturách a u všech druhů hlodavců. Stejně tak je poměr mezi hustotou nervových a nonneurálních buněk v každé struktuře, a tím pádem v celém mozku konstantní napříč druhy, nehledě na velikost jejich mozku. Dále, čím je mozek větší, tím se skládá z většího počtu neuronů a ještě většího počtu nonneurálních buněk, zvláště v mozkové kůře a ostatních oblastech (v mozečku ne). Jak se zvětšuje počet neuronů, tak se zvětšuje jejich velikost, avšak nonneurální buňky zůstávají v průměru stejně velké. Samotné porovnání dat mezi myši a kapybarou je následující. V mozkové kůře je v mozku kapybary 22krát více nervových buněk (jsou 10krát větší) a 154krát více nonneurálních buněk (1.8krát větší). V mozečku je 28krát více nervových buněk (3krát větší) a 82krát více nonneurálních buněk (1.3krát větší). Zajímavé by bylo porovnat tyto početní poměry v závislosti na tělesné hmotnosti a velikosti těla a mozku s lidským mozkiem. Zvláštností je, že čím je větší nárůst nonneurálních buněk mezi dvěma druhy, tím menší je příspěvek velikosti nervových buněk na celkovou velikost

mozkové struktury. Zvláště to platí pro mozkovou kůru a ostatní oblasti. Nejpravděpodobnější příčinou je silný selekční tlak, který působí proti zvětšování velikosti nervových buněk, za účelem vyhnouti se přílišnému narůstání a zrychlení nabývání počtu neuronů v mozku.

Další výzkum, kde byla použita IF, proběhl u potkanů. Položenou otázkou bylo, jakým způsobem ovlivňuje stárnutí jedinců distribuci neuronů a nonneurálních buněk, a to v případech mezi novorozeným jedincem po dovršení dospělosti, včetně již dospělého jedince a období stáří jedince. Vzhledem k tomu, že se jedná o zatím jedinou publikaci zabývající se ontogenezí za použití IF, uvádím jí v této kapitole. I dnes je stále trochu nejasné, zda ztráta neuronů je klíčová ve spojení se stárnutím mozkové tkáně a následném snížení kognitivních schopností. Výsledky ukázaly, že v průběhu života se počet nervových buněk nejprve zvyšuje a poté snižuje. Jako modelová zvířata bylo použito 38 potkanů ve věku 1 měsíc (n=4), 2 měsíce (n=9), 3 měsíce (n=8), 4 měsíce (n=4), 5 měsíců (n=4), 12 měsíců (n=6) a 22 měsíců (n=3). Jelikož většina zvířat byli samci, tak ještě nebylo zjištěno, zda pohlaví ovlivňuje počet nervových buněk. U potkana se mezi 1. a 22. měsícem života zvětšuje velikost těla (body mass - BoM) 16krát, zatímco velikost mozku (brain mass – BrM) se také zvětšuje, ale pouze 1.45krát. V mozku se zvětšuje každá struktura, kromě čichového laloku (olfaktoriální bulbus – OB). Žádná ze struktur neukazuje tendenci ke snižování objemu s nárůstem věku. Během prvního měsíce života ještě není dosaženo plného počtu nervových buněk. Výrazné zvyšování počtu neuronů nastává mezi 1. a 2. měsícem života ve všech oblastech mozku, v některých i více než dvojnásobně. V mozkové kůře nárůst o 78.7 %, hipokampu 145.0 %, mozečku 52.9 %, čichovém laloku 84.8 % a v ostatních oblastech mozku 124.5 %. Celkový nárůst neuronů v celém mozku za toto období je 64.7 % (z 111.9 ± 8.2 až na 184 ± 11.2 milionů neuronů). Ve 3. měsíci je celkový počet neuronů v mozku oproti 1. měsíci ještě větší, a to o 74.2 %. Od 3. měsíce a dále až do 22. měsíce postupně počet neuronů v každé struktuře klesá. K 22. měsíci je v mozkové kůře a mozečku o 30 % méně neuronů než ve 3. měsíci, hipokampu o 33 % méně neuronů než ve 3. měsíci a v čichovém laloku o 17 % méně neuronů než ve 3. měsíci. Pouze v ostatních oblastech mozku není žádný výrazný rozdíl v počtu neuronů. Nastávají i změny v počtu nonneurálních buněk. V čichovém laloku je ve 3. měsíci o 90.8 % nonneurálních buněk více než v 1. měsíci a v tom samém období v ostatních oblastech mozku je počet nonneurálních buněk o 58.1 % vyšší. V mozkové kůře, hipokampu a mozečku není mezi 1. a 3. měsícem života žádný výrazný rozdíl v počtu nonneurálních buněk. Dále také mezi 3. a 22. měsícem života zůstává ve všech strukturách počet nonneurálních buněk přibližně stejný (Mota a Herculano-Houzel, 2012). U starších jedinců ve věku mezi 12. a 22. měsícem je větší variabilita v počtu neuronů v jednotlivých strukturách, zatímco u mladších

jedinců je zanedbatelná. Prvním možným vysvětlením je, že u některých zvířat ztrácí některé struktury neurony s věkem rychleji než jiné. Alternativním vysvětlením může být, že neuronální ztráty docházejí ve všech strukturách stejně, avšak někteří jedinci jsou na tyto ztráty více náchylní. Třetí možností jsou neurodegenerativní onemocnění, která postihují jen některá zvířata v určité fázi života (Brautigam a kol. 2012).

3.3. Hmyzožravci (*Eulipotyphla*)

Mezi kvantifikované druhy hmyzožravců patří následující: rejsek druhu *Sorex fumeus*, rejsek krátkoocasý (*Blarina brevicauda*), krtek hvězdonosý (*Condylura cristata*), krtek bělohlavý (*Parascalops breweri*) a krtek východoamerický (*Scalopus aquaticus*) (Sarko a kol., 2009). Velikost těla těchto druhů se liší přibližně 12krát – rejsek druhu *Sorex fumeus* váží ≈ 8 g a krtek východoamerický váží ≈ 95 g. Co se velikosti mozku týče, liší se tyto druhy přibližně 6krát, v počtu mozkových buněk přibližně 5.5krát, a v celkovém počtu neuronů rovněž - přibližně 6krát. Poměr relativní hmotnosti mozkových struktur je mezidruhově relativně konstantní a nekoreluje s celkovou velikostí mozku. Mozková kůra spolu s hippocampem zastupují $48.4 \pm 5.2\%$, mozeček $12.6 \pm 2.6\%$, čichové laloky $6.3 \pm 1.0\%$ a ostatní oblasti $31.6 \pm 4.0\%$ celkového objemu mozku. Průměrné zastoupení neuronů ve strukturách se také mezi druhy výrazně neodlišuje. Nejvíce nervových buněk obsahuje mozeček: $64.6 \pm 9.5\%$. Další v pořadí je mozková kůra spolu s hippocampem: $16.0 \pm 6.0\%$ a čichový lalok: $11.2 \pm 3.2\%$. Ostatní oblastí mozku, navzdory 32% velikosti celého mozku, obsahují pouhých $8.5 \pm 3.8\%$ celkového počtu neuronů (Sarko a kol., 2009).

Absolutní hodnoty počtu neuronů jsou u nejmenšího ze zkoumaných hmyzožravců, rejseka druhu *Sorex fumeus*, následující: mozková kůra obsahuje 7.14 ± 0.90 milionů neuronů, mozeček 20.87 ± 4.66 milionů, hipokampus 2.59 ± 0.79 milionů, čichové laloky 3.33 ± 1.05 milionů a zbylé oblasti mozku obsahují 5.56 ± 1.49 milionů nervových buněk. Mozkové oblasti největšího ze zkoumaných druhů - krtka východoamerického (*Scalopus aquaticus*) zastupují v mozkové kůře 22.82 ± 5.17 milionů, mozečku 158.55 ± 13.63 milionů, hipokampu 5.86 ± 0.73 milionů, čichových lalocích 34.61 ± 5.96 milionů a ve zbylých oblastech mozku 16.56 ± 2.99 milionů nervových buněk (Sarko a kol., 2009).

3.4. Primáti (*Primates*)

Vzhledem k tomu, že mezi primáty patří i člověk, jsou primáti skupina živočichů, na kterou je soustředěn veliký zájem o kvantifikaci nervových buněk.

První publikovaná studie se zabývala následujícími druhy: komba Garnettova (*Otolemur garnettii*), kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*), mirikiņa obecná (*Aotus trivirgatus*), kotul veverkovitý (*Saimiri sciureus*), makak rhesus (*Macaca mulatta*) a malpa hnědá (*Cebus apella*) (Herculano-Houzel a kol., 2007). Návazná studie zahrnovala následující druhy: maki trpasličí (*Microcebus murinus*), tamarína skákavého (*Callimico goeldii*), makaka jávského (*Macaca fascicularis*), makaka kápoového (*Macaca radiata*) a paviána babuin (*Papio cynocephalus*) (Gabi a kol., 2010). Velikost těla se mezi makim trpasličím (60 g) a paviánem babuin (8000 g) liší 133krát, velikost mozkové kůry 132krát, velikost mozečku 35krát a velikost ostatních oblastí mozku 34krát. Počet nervových buněk se mezi těmito dvěma druhy liší v mozkové kůře 129krát, mozečku 35krát a ostatních oblastech mozku 25krát (Gabi a kol., 2010). Z hominidů byly kvantifikovány druhy orangutan bornejský (*Pongo pygmaeus*), gorila (*Gorilla gorilla*) (Herculano-Houzel a Kaas, 2011) a člověk (*Homo sapiens sapiens*) (Azevedo a kol., 2009). U gorily a orangutana byly populace buněk spočítány pouze v jedné struktuře, a to v mozečku. Důvodem byla nedostupnost mozků těchto druhů. Velikost mozečku a počet buněk v něm u těchto dvou druhů je podobný. V průměru váží 36.31 ± 4.34 g a obsahuje 28.9 ± 3.78 miliard buněk. Mozeček gorily je zastoupen 26.4 miliard neuronů (90.1% všech buněk mozečku) a mozeček orangutana 26.3 ± 2.47 miliard neuronů (92.3% všech buněk mozečku) (Herculano-Houzel a Kaas, 2011).

Pro lidský mozek se předpokládalo, díky stereologickým metodám, že obsahuje ≈ 100 miliard neuronů a až 10krát více nonneuronálních buněk. Kvantifikace pomocí IF ukázala, že nervových buněk je v lidském mozku 86.06 ± 8.12 miliard a poměr nervových a nonneurálních buněk je přibližně 1:1 (Azevedo a kol., 2009; Bahney a von Bartheld, 2013). Navzdory tomu, že mozková kůra představuje 82% celkové velikosti lidského mozku, obsahuje tato struktura 16.34 ± 2.17 miliard neuronů (pouhých 19% celkového počtu neuronů). Mozeček, který představuje 10% celkové velikosti mozku, obsahuje 69.03 ± 6.65 miliard nervových buněk (80% celkového počtu neuronů). Méně než 1% procento neuronů je lokalizováno v ostatních oblastech mozku. Druhou polovinu všech buněk v lidském mozku představují buňky nonneurální povahy. Ze všech nonneurálních buněk v lidském mozku je

lokalizováno v mozkové kůře 72% (60.84 ± 7.02 miliard), mozečku 19% (16.04 ± 2.17 miliard) a ostatních oblastech mozku 9% (7.73 ± 1.45 miliard) nonneurálních buněk mozku (Azevedo a kol., 2009).

3.5. Sudokopytníci (*Artiodactyla*)

Vybranými druhy jsou prase domácí (*Sus scrofa domesticus*), antilopa skákavá (*Antidorcas marsupialis*), buvolec běločelý (*Damaliscus dorcas phillipsi*), kudu velký (*Tragelaphus strepsiceros*) a žirafa (*Giraffa camelopardalis*) (Kazu a kol., 2014). Mezi nejmenší antilopou skákavou (25 Kg) a největším sudokopytníkem žirafou (470 Kg) se průměrná hmotnost těla liší 18.8krát, velikost mozku 9.1krát a celkový počet neuronů v mozku 5.0krát. Mozková kůra a hippocampus představuje $67.2 \pm 2.4\%$, mozeček $11.4 \pm 0.9\%$, a ostatní oblasti mozku $21.3 \pm 2.3\%$ celkové velikosti mozku. Stejně jako u jiných savčích řádů, i u sudokopytníků obsahuje nejvíce neuronů mozeček s $82.3 \pm 0.9\%$ všech mozkových nervových buněk. Mozková kůra obsahuje $15.4 \pm 0.8\%$ a ostatní oblasti mozku $2.4 \pm 0.3\%$ celkového počtu neuronů v mozku (Kazu a kol., 2014).

Velikostí těla nejmenší antilopa skákavá (*Antidorcas marsupialis*) má nervové zastoupení v mozkové kůře 375.49 milionů neuronů, v mozečku 2.26 miliard, hipokampu 20.48 milionů, čichových lalocích 16 milionů a ve zbylých oblastech mozku 70.48 milionů nervových buněk. Naopak mozek největšího z kvantifikovaných druhů žirafy (*Giraffa camelopardalis*) obsahuje mozková kůra 1.67 miliard neuronů, mozeček 8.88 miliard, hipokampus 58.59 milionů, čichové laloky 24.68 milionů a zbylé oblasti mozku 150.65 milionů neuronů (Kazu a kol., 2014).

Rząd	Drżh	MBr	NBr	NBr	NBr	MCx	NCx	NCx	MHp	NHp	NNHp	MOB	NOB	NNOB	MCb	NCb	NNCb	MRoB	NRoB	NNRoB		
	(g)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(g)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(g)	(g)	(x10 ⁶)	(g)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(g)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(g)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)		
Afrotheria	<i>A. frontatus</i>	0.812 ± 0.044	65.074 ± 2.124	46.361 ± 0.527	0.388 ± 0.024	19.870 ± 2.103	19.712 ± 4.369	0.051 ± 0.011	1.646 ± 0.500	1.658 ± 0.246	0.050	0.050	0.050	0.050	0.084 ± 0.004	34.488 ± 3.207	8.155 ± 0.813	0.289 ± 0.013	9.070 ± 1.069	16.835 ± 3.276		
	<i>D. dorsalis</i>	12.8	504.564	413.574	6.830	90.650	166.660	0.730	8.313	16.877	0.050	0.050	0.050	0.050	1.920 ± 0.168	360.929 ± 89.312	77.571 ± 23.368	3.330 ± 0.401	44.671 ± 14.012	152.467 ± 28.997		
	<i>E. myurus</i>	1.040 ± 0.082	129.190 ± 4.424	78.594 ± 7.733	0.355 ± 0.009	16.423 ± 0.265	18.131	18.131	0.116	9.443 ± 4.284	8.097 ± 1.176	0.050 ± 0.010	0.050 ± 0.010	0.050 ± 0.010	0.168 ± 0.002	89.312 ± 2.852	23.368	0.401 ± 0.063	14.012 ± 3.258	28.997 ± 7.906		
	<i>L. africana</i>	4.618.62	257.040	216.060	2.847.95	5.590	150.150	24.42	36.63	1.730	908.37	2.860	41.88	908.37	1.171.63	250.710	38.510	564.67	740	27.400		
	<i>P. capensis</i>	16.853 ± 1.495	755.653 ± 72.145	620.622 ± 37.616	9.184 ± 0.182	171.209 ± 35.277	316.979 ± 28.785	1.294 ± 0.464	26.712 ± 6.216	49.654 ± 15.244	14.791	20.909	0.290	20.909	2.058 ± 0.224	488.373 ± 42.322	91.005 ± 30.180	4.317 ± 0.625	69.358 ± 0.762	162.985 ± 6.105		
Artiodactyla	<i>P. tetradactylus</i>	2.440 ± 0.109	156.881 ± 20.6	103.349 ± 15.610	0.968 ± 0.076	27.652 ± 6.497	32.828 ± 5.773	0.271 ± 0.017	6.294 ± 0.658	7.659 ± 0.555	0.159 ± 0.009	0.159 ± 0.009	0.159 ± 0.009	12.828 ± 0.380	14.776 ± 5.204	110.653 ± 14.948	34.658 ± 15.801	0.894 ± 0.022	12.232 ± 0.188	28.204 ± 5.408		
	<i>A. marsupialis</i>	121.302	3.076	59.38	355.01	3.434	20.48	1.200	16.00	11.458	2.260	27.830	70.48	32.620	92.24	150.65	58.71	13.850	106.28	8.16	31.55	
Eulipotyphla	<i>D. dorcas phillipsi</i>	530.078	11.234.68	382.13	1.611.41	7.486	58.59	2.052	24.68	58.71	2.400	70.680	150.65	67.730	8.880	8.880	8.880	70.680	150.65			
	<i>G. camelopardalis</i>	58.580	2.229.2	33.852	280.05	1.928	12.91	0.822	9.20	9.20	1.860	13.850	58.71	8.128	1.860	1.860	1.860	13.850	58.71			
	<i>S. scrofa domesticus</i>	314.068	6.128.33	201.068	764.71	10.936	28.36	5.546	38.33	38.33	4.040	64.742	106.28	31.776	4.040	4.040	4.040	64.742	106.28			
	<i>T. striperos</i>	0.845 ± 0.50	141.87 ± 23.43	90.51 ± 29.46	0.389 ± 0.021	15.20 ± 3.30	29.25 ± 8.70	0.031 ± 0.006	2.05 ± 0.23	2.76 ± 0.53	0.040 ± 0.005	0.040 ± 0.005	0.040 ± 0.005	0.040 ± 0.005	0.138 ± 0.012	105.92 ± 22.10	19.48 ± 6.42	0.244 ± 0.026	8.16 ± 2.18	31.55 ± 5.95		
	<i>C. cristata</i>	0.3750 ± 0.0251	58.83 ± 6.67	37.42 ± 12.32	0.1794 ± 0.0119	14.20 ± 1.04	14.20 ± 1.04	0.0174 ± 0.0022	1.2206 ± 0.2109	1.6173 ± 0.3504	0.0256 ± 0.0032	0.0256 ± 0.0032	0.0256 ± 0.0032	0.0256 ± 0.0032	0.0369 ± 0.0053	33.4289 ± 5.8210	4.41 ± 1.28	0.1132 ± 0.0092	6.3369 ± 0.6362	13.32 ± 1.12		
	<i>B. brevicauda</i>	0.802 ± 0.030	140.35 ± 7.74	89.17 ± 9.44	0.402 ± 0.017	13.38 ± 1.62	37.55 ± 4.82	0.027 ± 0.002	2.31 ± 1.08	2.32 ± 0.14	0.049 ± 0.008	0.049 ± 0.008	0.049 ± 0.008	0.049 ± 0.008	0.102 ± 0.005	100.78 ± 13.85	7.01 ± 1.10	0.228 ± 0.009	7.13 ± 1.50	31.38 ± 4.82		
	<i>P. breweri</i>	1.146 ± 0.053	238.39 ± 9.31	119.52 ± 15.53	0.382 ± 0.032	22.82 ± 5.17	29.57 ± 3.88	0.094 ± 0.001	5.86 ± 0.73	8.97 ± 1.67	0.082 ± 0.005	0.082 ± 0.005	0.082 ± 0.005	0.082 ± 0.005	0.153 ± 0.008	158.55 ± 13.63	17.51 ± 3.16	0.370 ± 0.042	16.56 ± 2.99	45.69 ± 8.82		
	<i>S. aquaticus</i>	0.1893 ± 0.0064	39.49 ± 3.95	25.62 ± 5.79	0.0688 ± 0.0136	7.14 ± 0.90	7.14 ± 0.90	0.0151 ± 0.0042	2.59 ± 0.79	2.14 ± 0.83	0.0120 ± 0.0020	0.0120 ± 0.0020	0.0120 ± 0.0020	0.0120 ± 0.0020	0.0201 ± 0.13	20.87 ± 4.66	5.29 ± 2.12	0.0724 ± 0.0101	5.56 ± 1.49	8.28 ± 1.44		
	<i>S. fumeus</i>	15.730	1.468.41	1.195.13	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74	3.297.74
	<i>A. trivirgatus</i>	52.208	3.690.52	3.297.74	12.984	357.13	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33
<i>C. apella</i>	7.780 ± 0.654	635.80 ± 115.73	590.74 ± 70.81	12.984	357.13	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	715.33	
Primates	<i>C. goeldii</i>	1.508.91 ± 299.14	86.060 ± 8.120	84.610 ± 9.830	1.232.93 ± 233.68	16.340 ± 2.170	60.840 ± 7.020	0.137	5.2	15	154.02 ± 19.29	117.56 ± 45.42	690 ± 120	7.730 ± 1.450	26.400 ± 6.650	9.79	16.040 ± 2.170	0.009	1.069	16.835 ± 3.276		
	<i>G. gorilla</i>	46.16	3.440	3.150	36.226	800.96	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760	2.760
	<i>H. sapiens</i>	87.346	6.376.16	7.162.90	48.274	1.660	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810
	<i>M. fascicularis</i>	61.47	3.780	4.880	48.274	1.660	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810
	<i>M. mulatta</i>	1.799	254.71	138.95	0.908	22.31	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65
<i>M. radiata</i>	61.47	3.780	4.880	48.274	1.660	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	3.810	
<i>M. murinus</i>	1.799	254.71	138.95	0.908	22.31	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	70.65	

Řád	Druh	MBr (g)	NBR (x10 ⁶)	MCx (g)	NCx (x10 ⁶)	NNCx (x10 ⁶)	MHP (g)	NHP (x10 ⁶)	NNHp (x10 ⁶)	MOB (g)	NOB (x10 ⁶)	NNOB (x10 ⁶)	MCb (g)	Ncb (x10 ⁶)	NNCb (x10 ⁶)	MROb (g)	NNROb (x10 ⁶)	NRoB (x10 ⁶)	NNRoB (x10 ⁶)
Primates	O. garretti	10.150 ± 0.060	936.00 ± 115.36	666.59 ± 63.50	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	P. cynocephalus	151.19	10.950	9.180	120.214	2.880	7.570	/	/	/	/	/	13.745	7.790	525.98	17.235	278.15	1.079.81	/
	P. pygmaeus	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	35.06 ± 4.34	26.300 ± 2.47	13.10 ± 1.69	/	/	/	/
Rodentia	S. sciureus	30.216	3.246.43	2.075.03	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C. ludovicianus	5.321 ± 0.197	473.94 ± 78.74	417.35 ± 27.35	2.586 ± 0.109	53.77 ± 6.04	183.45 ± 17.96	/	/	/	/	/	0.789 ± 0.093	350.08 ± 72.18	66.16 ± 39.27	1.945 ± 0.146	34.09 ± 0.59	167.74 ± 5.02	167.74 ± 5.02
	C. porcellus	3.759 ± 0.486	239.62 ± 4.08	238.24 ± 9.14	1.938 ± 0.231	43.51 ± 3.17	108.61 ± 12.78	/	/	0.103 ± 0.013	6.06 ± 1.30	10.15 ± 4.22	0.500 ± 0.077	167.85 ± 2.18	36.29 ± 4.51	1.218 ± 0.178	2.121 ± 0.178	22.19 ± 9.43	83.18 ± 8.14
	D. primnolopha	18.365 ± 1.90	853.23 ± 1.90	1.024.28 ± 1.214	8.913 ± 2.58	110.64 ± 2.58	416.21 ± 0.95	/	/	0.737 ± 0.162	58.12 ± 4.95	72.60 ± 19.68	2.742 ± 0.196	673.49 ± 48.14	155.99 ± 32.98	5.972 ± 0.514	5.972 ± 0.514	43.20 ± 4.98	356.84 ± 10.31
	H. glaber	0.413 ± 0.045	29.18 ± 3.34	27.76 ± 1.74	0.184 ± 0.026	6.15 ± 1.06	8.40 ± 1.20	/	/	0.021 ± 0.001	2.30 ± 0.64	3.57 ± 1.55	0.048 ± 0.004	15.74 ± 2.85	5.48 ± 1.27	0.160 ± 0.019	4.98 ± 0.85	10.31 ± 1.84	
	H. hydrochoeris	76.036 ± 3.756	1.601.12 ± 72.64	3.265.32 ± 974.58	48.175 ± 2.714	306.50 ± 62.73	1.847.82 ± 512.39	/	/	1.302 ± 0.031	28.56 ± 8.52	67.39 ± 25.02	6.632 ± 1.312	1.157.81 ± 5.52	570.94 ± 81.10	19.927 ± 0.270	108.25 ± 4.40	779.17 ± 381.09	
	M. auratus	0.136 ± 0.416	71.76 ± 9.89	39.32 ± 11.94	0.173 ± 0.048	13.69 ± 3.62	12.06 ± 1.35	/	/	0.014 ± 0.011	3.89 ± 0.35	5.46 ± 2.28	0.056 ± 0.030	42.22 ± 12.35	6.95 ± 1.71	0.172 ± 0.057	11.96 ± 1.16	14.85 ± 8.88	
	M. musculus	0.028 ± 9.288	10.41 ± 512.96	6.66 ± 653.80	0.015 ± 4.448	2.24 ± 71.45	3.67 ± 254.80	/	/	0.004 ± 0.156	1.25 ± 18.76	1.15 ± 22.94	0.005 ± 1.412	9.28 ± 396.67	9.28 ± 124.58	0.019 ± 3.272	1.58 ± 26.08	3.59 ± 251.42	
	O. cuniculus	2.21 ± 0.071	211.23 ± 2.93	202.4 ± 4.31	0.924 ± 0.05	26.09 ± 2.16	71.83 ± 6.71	/	/	0.132 ± 0.077	9.14 ± 11.26	21.13 ± 9.60	0.330 ± 0.272	162.51 ± 139.17	36.37 ± 29.00	0.824 ± 0.683	13.49 ± 18.68	73.07 ± 47.22	
	P. caymenensis	1.801 ± 0.292	200.13 ± 12.62	131.51 ± 7.11	0.769 ± 0.113	31.02 ± 3.03	45.69 ± 5.68	/	/	0.023 ± 0.226	3.68 ± 25.10	9.60 ± 39.92	0.242 ± 0.874	11.18 ± 342.83	11.18 ± 110.80	0.153 ± 1.943	4.24 ± 33.49	5.98 ± 210.02	
	R. norvegicus	5.774 ± 0.306	478.76 ± 59.75	570.4 ± 5.60	2.730 ± 0.178	77.33 ± 2.63	209.65 ± 13.00	/	/	0.226 ± 0.019	25.10 ± 9.14	39.92 ± 15.87	0.874 ± 0.069	342.83 ± 71.18	110.80 ± 9.07	1.943 ± 0.146	33.49 ± 17.13	210.02 ± 3.42	
	S. carolinensis	0.306 ± 0.071	59.75 ± 10.41	5.60 ± 1.78	0.178 ± 0.05	2.63 ± 0.83	13.00 ± 4.31	/	/	0.019 ± 0.019	9.14 ± 9.14	15.87 ± 15.87	0.069 ± 0.069	71.18 ± 71.18	9.07 ± 9.07	0.146 ± 0.146	17.13 ± 17.13	3.42 ± 3.42	

Tab. 1: Absolutní hodnoty. Řády a druhy jsou řazeny abecedně. MBr (brain mass) = hmotnost mozku, NBr (number of brain neurons) = počet neuronů v mozku, NNBr (number of nonneuronal cells in brain) = počet nonneurálních buněk v mozku, MCx (cerebral cortex mass) = hmotnost mozkové kůry, NCx (number of cerebral cortex neurons) = počet neuronů v mozkové kůře, NNCx (number of nonneuronal cells in cerebral cortex) = počet nonneurálních buněk v mozkové kůře, MHP (hippocampus mass) = hmotnost hipokampu, NHP (number of hippocampus neurons) = počet neuronů v hipokampu, NNHP (number of nonneuronal cells in hippocampus) = počet nonneurálních buněk v hipokampu, MOB (number of olfactory bulb neurons) = hmotnost čichových laloků, NOB (number of olfactory bulb neurons) = počet neuronů v čichových lalocích, NNOB (number of nonneuronal cells in olfactory bulb) = počet nonneurálních buněk v čichových lalocích, MCb (cerebellar mass) = hmotnost mozečku, Ncb (number of cerebellar neurons) = počet neuronů v mozečku, NNCb (number of nonneuronal cells in cerebellum) = počet nonneurálních buněk v mozečku, MROb ("rest of the brain" mass) = hmotnost "zbylých oblastí mozku", NRoB (number of "rest of the brain" neurons) = počet neuronů ve "zbylých oblastech mozku", NNROb (number of nonneuronal cells in "rest of the brain") = počet nonneurálních buněk ve "zbylých oblastech mozku", / = absolutní hodnoty nejsou k dispozici.

4. Hustota neuronů

Pro ilustraci variability v hustotě neuronů udávám níže maximální a minimální hodnoty. Může se proto zdát, že rozdíly jsou enormní. Při zahrnutí všech druhů skupiny nejsou rozdíly takto vysoké. Případné odchylky a extrémy jsou uvedeny.

4.1. Afrotheria

V mozkové kůře a mozečku skupiny afrotheria se prokázal trend ke snižování nervové hustoty s narůstající velikostí struktury. Stejný trend byl pozorován i v hipokampu a „zbylých oblastech mozku“, avšak závislost denzity na velikosti struktury zde nebylaprůkazná. To je však velmi pravděpodobně zapříčiněno malým počtem studovaných druhů ($n = 5$). V mozkové kůře damana pralesního (*Dendrohyrax dorsalis*) je hustota nervových buněk 13.272 neuronů/mg a zlatokrta hotentotského (*Amblysomus hottentotus*) 51.070 neuronů/mg, v hipokampu damana pralesního 11.450 neuronů/mg a bércouna čtyřprstého (*Petrodromus tatradyctylus*) 54.601 neuronů/mg, v mozečku damana skalního (*Procavia capensis*) 175.610 neuronů/mg a zlatokrta hotentotského 531.494 neuronů/mg a ve zbylých oblastech mozku damana pralesního 13.423 neuronů/mg a bércouna jihoafrického (*Elephantulus myurus*) 34.520 neuronů/mg. Čichové laloky byly dostupné pouze u druhů: bércoun jihoafrický (*Elephantulus myurus*) s hustotou 194.678 neuronů/mg, bércoun čtyřprstý (*Petrodromus tatradyctylus*) s hustotou 80.805 neuronů/mg a daman skalní (*Procavia capensis*) s hustotou 73.110 neuronů/mg (Neves a kol., 2014).

Podobně jako bylo demonstrováno u některých primátů (Young, a kol., 2013), mozková kůra slona afrického (*Loxodonta Africana*) není v hustotě neuronů homogenní, ale zvyšuje se anterior-posteriorně. Je tedy nejnižší v oblastech frontální kůry a naopak nejvyšší v okcipitální oblasti obsahující primární zrakovou kůru (V1). Mozková kůra slona afrického jako celek je v porovnání s lidskou mozkovou kůrou více jak 2krát objemější, ale hustota neuron je třetinová. Sloní mozeček je také zvláštním případem, který se vymyká pravidlům pro tuto strukturu jak u ostatních druhů skupiny Afrotheria tak u ostatních savců. Obsahuje více než dvojnásobně vyšší hustotu neuronů a v důsledku tedy vyšší počet neuronů, než lze předpokládat na základě jeho velikosti. Naopak „zbylé oblasti mozku“ mají nižší hustotu a obsahují tedy nižší počet neuronů, než je předpokládáno na základě jejich velikosti. Mozková kůra, včetně hipokampu, má hustotu 1964 neuronů/mg, mozeček 213.983 neuronů/mg,

hipokampus 1500 neuronů/mg, čichový lalok 21.687 neuronů/mg a zbylé oblasti mozku 1314 neuronů/mg (Herculano-Houzel a kol., 2014a).

4.2. Hlodavci (*Rodentia*)

Hustota nervových buněk v mozkových strukturách klesá s jejich narůstající velikostí (Herculano-Houzel a kol., 2006). Je možné, že tento vztah platí i pro skupinu Glires (Herculano-Houzel a kol., 2011), což je skupina sdružující hlodavce (*Rodentia*) a zajícovce (*Lagomorpha*). Toto tvrzení je zatím podloženo pouze jediným druhem zajícovců – králíkem divokým (*Oryctolagus cuniculus*).

V jednotlivých anatomicky funkčních oblastech myší mozkové kůry se také projeví rozdíl v hustotě neuronů. Ve zrakových oblastech mozkové kůry je hustota vyšší než průměrná, oproti ostatním – nezrakovým oblastem, ve kterých se hustota systematicky nemění s velikostí, či objemem oblasti. Zrakové oblasti obsahují v průměru 100 000 neuronů/mm³, zatímco nezrakové oblasti 50 000-100 000 neuronů/mm³, tudíž až 2krát více. I když v oblasti primární zrakové kůry (V1) je největší hustota neuronů (155 426 neuronů/mm³), není to, díky malé velikosti, struktura s největším počtem neuronů. Některé větší funkční korové oblasti tedy mají více neuronů nehledě na nižší hustotu (Herculano-Houzel a kol., 2013). Rypoši vykazují nižší hustotu neuronů v mozkové kůře a vyšší v čichových lalocích (Kverková a kol., v přípravě).

4.3. Hmyzožravci (*Eulipotyphla*)

U hmyzožravců je hustota nonneurálních buněk téměř konstantní, tj. nekoreluje s velikostí dané mozkové struktury. Stejný vztah platí pro nervové buňky v hipokampu, mozečku, čichovém laloku a ve zbytku mozku (autoři takto definují oblasti mozku zahrnující prodlouženou míchu, střední mozek, mezimozek, bazální ganglia a septum). V mozkové kůře naopak hustota neuronů rapidně klesá s rostoucí velikostí struktury. Z výše uvedeného vyplývá, že počet nervových buněk v čichovém laloku se lineárně zvyšuje s rostoucí velikostí, stejně jako v případě nonneurálních buněk všech struktur a nervových buněk v hipokampu, mozečku a zbytku mozku. Krtek hvězdonošý (*Condylura cristata*) výrazně vybočuje tím, že má mnohem menší densitu neuronů v čichových lalocích než ostatní studované druhy hmyzožravců (Sarko a kol., 2009). Tento extrémní případ byl poté vyřazen a teprve na

základě zbylých druhů vycházela pozitivní alometrie. Vzhledem k tomu, že alometrické vztahy spočteny na základě analýzy 4 druhů, z nichž 2 jsou krtci, je otázkou, zda jsou tato škálovací pravidla pro hmyzožravce spolehlivá.

4.4. Primáti (*Primates*)

U veškerých kvantifikovaných druhů primátů se bez výrazných rozdílů projeví stejné trendy v hustotě neuronů (Herculano-Houzel a kol., 2007). Pro mozkovou kůru také platí vztah lineárního narůstání hustoty neuronů s velikostí. V porovnání s ostatními druhy savců s podobným počtem neuronů mají primáti mnohem větší hustotu (Herculano-Houzel a kol., 2014b). Mozeček obsahuje výrazně větší hustotu neuronů, než ostatní struktury. Ve zbylých oblastech mozku se hustota neuronů snižuje s nárůstem jejich velikosti (Gabi a kol., 2010).

U několika druhů primátů byla rovněž kvantifikována hustota buněk v různých oblastech mozkové kůry. Nejvyšší hustotu neuronů korových oblastí obsahuje oblast V1 – primární zraková oblast mozkové kůry. Tento vztah platí jak pro poloopice (Collins a kol., 2010), tak pro člověka (Ribeiro a kol., 2013). Naopak oblast mozkové kůry primátů s nejnižší hustotou neuronů představuje primární motorická oblast. V té se projevil trend vyšší hustoty neuronů v laterálních oblastech, které představují centrum ovládající ruce a obličej a nižší hustoty v mediálních oblastech, které ovládají trup a dolní končetiny. Absolutní hodnoty primární motorické oblasti M1 pro jednotlivé druhy primátů jsou následující: komba Garnettova (*Otolemur garnettii*) – 29.04 ± 12.32 milionů neuronů/g, mirikina loretská (*Aotus nancymaae*) – 41.37 milionů neuronů/g, kotul veverkovitý (*Saimiri sciureus*) – 30.00 milionů neuronů/g, makak vepří (*Macaca nemestrina*) – 23.51 ± 0.49 milionů neuronů/g, pavián babuin (*Papio cynocephalus*) – 28.11 milionů neuronů/g, pavián pláštíkový (*Papio hamadryas*) – 28.10 milionů neuronů/g a šimpanz učenlivý (*Pan troglodytes*) – 19.30 milionů neuronů/g (Young a kol., 2013).

Lidská mozková kůra byla anterior-posteriorně rozdělena na 100 řezů. Prvních 40 frontálních řezů má stabilní hustotu neuronů. Ve zbylých řezech postupně nabývá na nervové hustotě ve směru od frontálního laloku a vrcholí v okcipitálním laloku s maximální hodnotou v oblasti V1, a to $58\,162 \pm 13\,640$ neuronů/mg (Ribeiro a kol., 2013). Tento trend byl potvrzen i u druhů nižších primátů: tamarína žltorukého (*Saguinus midas*), mirikiňy obecné (*Aotus trivirgatus*), vřešťana černého (*Alouatta caraya*) a malpy hnědé (*Cebus apella*) (Cahalane a kol., 2012).

Zajímavým zjištěním je existence rozdílu hustoty neuronů v lidském čichovém laloku mezi pohlavími. U žen je hustota 53.7 milionů neuronů/g, zatímco u mužů 25.8 milionů neuronů/g. Muži tedy mají v této oblasti mozku o 48.4 % nižší hustotu neuronů než ženy (Oliveira-Pinto a kol., 2014). Nehledě na individuální rozdíly, toto zjištění naznačuje, že ženy vnímají pachy citlivěji než muži.

4.5. Sudokopytníci (*Artiodactyla*)

U skupiny sudokopytníků se neprojevil žádný zvláštní vztah mezi hustotou neuronů a velikostí jednotlivých mozkových struktur. Pro srovnání poslouží druh kudu velký (*Tragelaphus stripceros*) a prase domácí (*Sus scrofa domesticus*). V mozkové kůře je hustota neuronů u kudu velkého 3.741 neuronů/mg a u prasete domácího 8.118 neuronů/mg, v mozečku 127.218 neuronů/mg u kudu velkého a 228.632 neuronů/mg u prasete domácího a ve zbylých oblastech mozku 1.642 neuronů/mg u kudu velkého a 4.238 neuronů/mg u prasete domácího (Kazu a kol., 2014). Oproti ostatním skupinám jsou hustoty neuronů v mozcích sudokopytníků velmi nízké.

5. Škálovací pravidla

Donedávna převládal názor, že buněčné složení mozkové tkáně se ve stejných oblastech mezi různými skupinami zásadně neliší. Tento předpoklad se ukázal jako nesprávný. Jak souvisí velikost mozku a počet buněk v něm? A nejenom v celém mozku, ale v jednotlivých strukturách napříč fylogeneticky odlišnými skupinami? Na tyto otázky pomohla metoda IF odpovědět.

Jak je uvedeno výše, k dnešnímu dni byly odhadnuty počty neuronů a nonneurálních buněk u zástupců několika savčích řádů. Tato data byla využita pro výpočet škálovacích pravidel mezi velikostí mozku či jeho částí a počtem neuronů respektive nonneurálních buněk. V této kapitole pojednávám o škálovacích pravidlech jednotlivých řádů a srovnávám je mezi sebou. Zaměřuji se především na škálovací pravidla pro neurony, protože ty se mezi jednotlivými taxony výrazně odlišují.

5.1. Afrotheria

Mezi struktury mozku afrotheria, na které byl rozdělen, patří: mozková kůra, hipokampus, mozeček a "zbylé oblasti mozku". Mozková kůra a mozeček mají ve skupině afrotheria společná škálovací pravidla. S rostoucí velikostí těchto struktur se snižuje hustota neuronů, tj. tyto struktury se zvětšují rychleji než se zvyšuje počet neuronů. V hipokampu a "zbylých oblastech mozku" hustota neuronů s velikostí neklesá, počet neuronů tedy narůstá lineárně s velikostí struktury. Vzhledem k tomu, že čichové laloky byly dostupné pouze u tří zkoumaných druhů, nedají se u skupiny afrotheria spolehlivě definovat jejich škálovací pravidla (Neves a kol., 2014).

Afrotheria nevykazují ve škálovacích pravidlech žádné ze struktur specifika, která by charakterizovala jen tuto skupinu. Mozková kůra skupiny afrotheria se řídí stejnými škálovacími pravidly jako ostatní skupiny s výjimkou primátů. Škálovací pravidla mozečku jsou společná afrotheria, hlodavcům a sudokopytníkům. Pro "zbylé oblasti mozku" platí stejná škálovací pravidla pro afrotheria, hlodavce, hmyzožravce a primáty.

5.2. Hlodavci (Rodentia)

Mezi struktury mozku hlodavců, na které byl rozdělen, patří: mozková kůra, mozeček a "zbylé oblasti mozku". Mozková kůra, mozeček a "zbylé oblasti mozku" mají ve skupině hlodavců společná škálovací pravidla. S rostoucí velikostí těchto struktur se snižuje počet neuronů, tj. tyto struktury se zvětšují rychleji než přibývá neuronů. Hustota neuronů klesá s velikostí velmi výrazně v mozkové kůře (Herculano-Houzel a kol., 2011).

Škálovací pravidla mozkové kůry jsou společná všem skupinám, kromě primátů. Pro mozeček platí stejná pravidla pro hlodavce, afrotheria a sudokopytníky. "Zbylé oblasti mozku" mají všechny skupiny, kromě sudokopytníků, stejná škálovací pravidla.

Extrémní případ škálovacích pravidel zahrnutých druhů hlodavců představuje rypoš lysý (*Heterocephalus glaber*). Jeho mozková kůra a mozeček obsahuje o přibližně 50 % méně nervových buněk než by měly obsahovat, když by se řídily škálovacími pravidly, které platí pro ostatní studované druhy hlodavců (Herculano-Houzel a kol., 2011). Z tohoto důvodu byl rypoš lysý vyřazen z dat, na základě kterých byly spočteny škálovací pravidla pro hlodavce. Vzhledem k tomu, že se jedná o téměř slepý druh žijící v podzemí, možným vysvětlením je

pokles neuronů soustředěný ve zrakovém laloku mozkové kůry.

5.3. Hmyzožravci (*Eulipotyphla*)

Mezi struktury mozku hmyzožravců, na které byl rozdělen, patří: mozková kůra, hipokampus, čichové laloky, mozeček a "zbylé oblasti mozku". V hipokampu, mozečku a "zbylých oblastech mozku" se denzita neuronů s velikostí struktury signifikantně nemění, počet neuronů tedy roste lineárně s velikostí těchto struktur. Pro zbývající části mozku (mozková kůra a čichové laloky) platí odlišná škálovací pravidla. S nabývajícím velikostí mozkové kůry se snižuje denzita neuronů. Naopak s rostoucí velikostí čichových laloků má hustota neuronů tendenci růst (Sarko a kol., 2009).

Škálovací pravidla mozkové kůry hmyzožravců jsou společná s pravidly skupin: sudokopytníci, afrotheria a hlodavci. Jedinou skupinou, která se těmito pravidly neřídí, jsou primáti. Pro čichové laloky platí, že počet neuronů roste rychleji než jejich velikost. Tento fenomén, který se ze zkoumaných skupin vyskytuje pouze u hmyzožravců, by se dal vysvětlit behaviorální specializací a senzoryckými požadavky větších ze zkoumaných druhů (např. krtek bělohavý – *Parascalops breweri*), kteří žijí v podzemí a orientují se převážně čichem a hmatem. Stejný případ vyšších hodnot v čichových lalocích byl prokázán u rypošů (Kverková a kol., v přípravě). Škálovací pravidla mozečku mají hmyzožravci společná pouze s primáty. Od pravidel ostatních skupin vybočují hustotou neuronů, kterou v této struktuře mají výrazně vyšší. To má za následek mnohem větší počet neuronů v mozečku než je tomu v mozečku o stejné velikosti ostatních skupin. Škálovací pravidla "zbylých oblastí mozku" hmyzožravců jsou společná všem ostatním skupinám s výjimkou sudokopytníků, kteří se jako jediná skupina v této struktuře liší.

5.4. Primáti (*Primates*)

Škálovací pravidla jsou společná všem zahrnutým druhům primátů (Herculano-Houzel a kol., 2007; Gabi a kol., 2010; Herculano-Houzel a Kaas, 2011), vč. člověka, jehož struktury vzhledem k velikosti obsahují očekávaný počet nervových buněk (Azavedo a kol., 2009; Herculano-Houzel, 2009; Herculano-Houzel, 2012). Veškeré struktury v mozku primátů (mozková kůra, mozeček a "zbylé oblasti mozku") mají lineární vztah mezi nárůstem velikosti a počtu neuronů.

Mozková kůra primátů se ve škálovacích pravidlech liší od všech ostatních zahrnutých skupin. S narůstající velikostí se signifikantně nemění hustota neuronů a tedy přibývá větší počet neuronů, než tomu je v mozkové kůře o stejné velikosti ostatních skupin. Stejný vztah platí i pro mozeček primátů. Škálovací pravidla mozečku sdílí primáti s hmyzožravci. Pro "zbylé oblasti mozku" platí společná pravidla u skupin primáti, hmyzožravci, hlodavci a afrotheria (Herculano-Houzel a kol., 2014b). Specifická škálovací pravidla mozkové kůry a mozečku mohou být vysvětlením absolutně vysokého počtu neuronů a výjimečných kognitivních schopností primátů.

5.5. Sudokopytníci (*Artiodactyla*)

Mezi struktury mozku sudokopytníků, na které byl rozdělen, patří: mozková kůra, mozeček, čichové laloky a "zbylé oblasti mozku". S rostoucí velikostí těchto struktur se snižuje hustota neuronů, tj. tyto struktury nabývají své velikosti rychleji než počtu neuronů. V čichových lalocích se hustota s velikostí signifikantně nemění, počet neuronů tedy roste lineárně s velikostí struktury (Kazu a kol., 2014).

Škálovací pravidla mozkové kůry sudokopytníků jsou společná s pravidly skupin: hmyzožravci, afrotheria a hlodavci. Jedinou skupinou, která se těmito pravidly neřídí, jsou primáti. Mozeček sudokopytníků má společná pravidla škálování s mozečkem skupin hlodavci a afrotheria. Čichové laloky se liší od stejné struktury ostatních skupin. Vykazují nejvyšší exponent ve vztahu nárůstu velikosti struktury a počtu neuronů. V porovnání například s primáty či hlodavci, čichové laloky o stejném počtu neuronů jsou u těchto skupin 10krát menší, tj. čichové laloky sudokopytníků mají, v porovnání s ostatními skupinami, nejnižší hustotu neuronů. Ve "zbylých oblastech mozku" sudokopytníků se homogenně snižuje hustota neuronů s velikostí struktury, stejně jako je tomu u ostatních skupin. Sudokopytníci se však odlišují od všech ostatních skupin tím, že jejich hustota neuronů ve "zbylých oblastech mozku" je výrazně nižší.

5.6. Škálovací pravidla pro nonneurální buňky

Škálovací pravidla nonneurálních buněk jsou značně konzervativní a neliší se ani mezi jednotlivými oblastmi mozku ani mezi studovanými taxony. Jejich hustota se s velikostí struktur signifikantně nesnižuje a počet nonneurálních buněk tedy roste lineárně s velikostí

mozku či struktury (například Sarko a kol., 2009; Herculano-Houzel a Kaas, 2011; Neves a kol., 2014; Kazu a kol., 2014; Herculano-Houzel a kol., 2014b).

6. Srovnání s ostatními obratlovci

Naprostá většina studií využívajících IF byla zaměřena na savce. Jak jsem již zmínil, IF je relativně novou metodou, a z tohoto důvodu je počet kvantifikovaných skupin zatím omezený. S rozšířením studovaných taxonů umožní srovnávat buněčné složení mozku a buněčná škálovací pravidla savců s tímtež pro ostatní obratlovce. Naše laboratoř (Katedra zoologie, Univerzity Karlovy v Praze) zaměřila svou pozornost na ptáky (*Aves*). Dosavadní zjištění jsou překvapivá. Hustota neuronů v koncovém mozku pěvců (*Passeriformes*) a papoušků (*Psittaciformes*) je ještě 3-6krát vyšší než v mozkové kůře primátů (Olkowicz a kol., v tisku), kteří jsou mezi savci v procesní kapacitě výjimeční. Pěvci a papoušci, na které je publikace zaměřena, vykazují vysokou úroveň učenlivosti a používání nástrojů (Huber a Gajdon, 2006; Auersperg a kol., 2012), stejně jako primáti. Ptáci tedy mají mnohonásobně menší velikost mozku se srovnatelným počtem a vyšší hustotou neuronů než primáti. Možným vysvětlením je selekční tlak na snížení hmotnosti vynucenou aktivním letem Z plazů byl studován pouze krokodýl nilský (*Crocodylus niloticus*) (Ngwenya a kol., 2013). Vzhledem k tomu, že jsou k dispozici data pro jediný druh, nelze prozatím odvodit pravidla buněčného škálování pro mozky plazů.

7. Závěr:

Cílem této práce bylo představit metodu izotropní frakcionace a přehledně shrnout dosavadní poznatky, které byly díky této relativně nové metodě dosaženy. V práci jsou uvedené absolutní počty neuronů a nonneurálních buněk v mozku studovaných savců. Dále poukazují na význam absolutního počtu neuronů a jejich distribuce v mozkové tkáni pro odhad kognitivních schopností studovaných druhů. Tato práce je rešerší pro mou diplomovou práci, ve které se budu zabývat výzkumem buněčného složení mozku u měkkozobích ptáků (*Columbiformes*).

8. Literatura

- Andrade-Moraes, C. et al. 2013. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain*. 136, 12 (2013), 3738–3752.
- Auersperg, A., Gajdon, G. and von Bayern, A. 2012. A new approach to comparing problem solving, flexibility and innovation. *Communicative & Integrative Biology*. 5, 2 (2012), 140–5.
- Azevedo, F., Andrade-Moraes, C., Curado, M., Oliveira-Pinto, A., Guimarães, D., Szczupak, D., Gomes, B., Alho, A., Polichiso, L., Tampellini, E., Lima, L., de Lima, D., da Silva, H. and Lent, R. 2013. Automatic isotropic fractionation for large-scale quantitative cell analysis of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*. 212, 1 (2013), 72–78.
- Azevedo, F., Carvalho, L., Grinberg, L., Farfel, J., Ferretti, R., Leite, R., Filho, W., Lent, R. and Herculano-Houzel, S. 2009. 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.
- Bahney, J. and Bartheld, C. 2014. Validation of the isotropic fractionator: Comparison with unbiased stereology and DNA extraction for quantification of glial cells. *Journal of Neuroscience Methods*. 222, (2014), 165–174.
- Brautigam, H., Steele, J., Westaway, D., Fraser, P., George-Hyslop, P., Gandy, S., Hof, P. and Dickstein, D. 2012. The isotropic fractionator provides evidence for differential loss of hippocampal neurons in two mouse models of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 7, 1 (2012), 1–5.
- Cahalane, D., Charvet, C. and Finlay, B. 2012. Systematic, balancing gradients in neuron density and number across the primate isocortex. *Frontiers in neuroanatomy*. 6, (2012), 28.
- Clutton-Brock and Harvey, P. 1980. Primates, brains and ecology. *Journal of Zoology*. 190, 3 (1980), 309–323.
- Collins, C., Airey, D., Young, N., Leitch, D. and Kaas, J. 2010. Neuron densities vary across and within cortical areas in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107, 36 (2010), 15927–15932.
- Collins, C., Leitch, D., Wong, P., Kaas, J. and Herculano-Houzel, S. 2013. Faster scaling of visual neurons in cortical areas relative to subcortical structures in non-human primate brains. *Brain Structure and Function*. 218, 3 (2013), 805–816.
- Collins, C., Young, N., Flaherty, D., Airey, D. and Kaas, J. 2010. 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), 5.
- Dicke, U. and Roth, G. 2016. Neuronal factors determining high intelligence. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 371, 1685 (2016), 20150180.
- Dunbar, R.I.M. 1992. Neocortex size as a constraint on group size in primates. *Journal of Human Evolution*. 22, 6 (1992), 469–493.
- Gabi, M., Collins, C.E., Wong, P., Torres, L.B., Kaas, J.H. and Herculano-Houzel, S. 2010. Cellular Scaling Rules for the Brains of an Extended Number of Primate Species. *Brain, Behavior and*

- Evolution*. 76, 1 (2010), 32–44.
- Glaser, J. and Glaser, E. 2000. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 20, 1 (2000), 115–126.
- Herculano-Houzel, S. 2009. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*. 3, (2009), 31.
- Herculano-Houzel, S. 2011. Scaling of Brain Metabolism with a Fixed Energy Budget per Neuron: Implications for Neuronal Activity, Plasticity and Evolution. *PLoS ONE*. 6, 3 (2011), e17514.
- Herculano-Houzel, S. 2012. 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 (2012), 10661–10668.
- Herculano-Houzel, S. and Kaas, J. 2011. 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, S. and Lent, R. 2005. 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, S., Avelino-de-Souza, K., Neves, K., Porfirio, J., Messeder, D., Feijó, L., Maldonado, J. and Manger, P. 2014a. The elephant brain in numbers. *Frontiers in neuroanatomy*. 8, (2014), 46.
- Herculano-Houzel, S., Collins, C., Wong, P. and Kaas, J. 2007. Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 9 (2007), 3562–7.
- Herculano-Houzel, S., Manger, P. and Kaas, J. 2014b. Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8, (2014), 77.
- Herculano-Houzel, S., Mota, B. and Lent, R. 2006. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 32 (2006), 12138–12143.
- Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Silva, A., Torres, L., Catania, K. and Kaas, J. 2011. Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs). *Brain, behavior and evolution*. 78, 4 (2011), 302–14.
- Herculano-Houzel, S., Watson, C. and Paxinos, G. 2013. Distribution of neurons in functional areas of the mouse cerebral cortex reveals quantitatively different cortical zones. *Frontiers in Neuroanatomy*. 7, (2013), 35.
- Huber, L. and Gajdon, G. 2006. Technical intelligence in animals: the kea model. *Animal Cognition*. 9, 4 (2006), 295–305.
- Jerison, H. *Evolution of the Brain and Intelligence*. 1973.
- Kazu, R., Maldonado, J., Mota, B., Manger, P. and Herculano-Houzel, S. 2014. Cellular scaling rules for the brain of Artiodactyla include a highly folded cortex with few neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8, (2014).

- Miller, D., Balaram, P., Young, N. and Kaas, J. 2014. Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8, (2014), 36.
- Mota, B. and Herculano-Houzel, S. 2012. How the Cortex Gets Its Folds: An Inside-Out, Connectivity-Driven Model for the Scaling of Mammalian Cortical Folding. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6, (2012), 3.
- Mullen, R., Buck, C. and Smith, A. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*. 116, 1 (1992), 201–11.
- Neves, K., Ferreira, F., Tovar-Moll, F., Gravett, N., Bennett, N., Kaswera, C., Gilissen, E., Manger, P. and Herculano-Houzel, S. 2014. Cellular scaling rules for the brain of afrotherians. *Frontiers in neuroanatomy*. 8, (2014), 5.
- Ngwenya, A., Patzke, N., Spocter, M., Kruger, J., Dell, L., Chawana, R., Mazenganya, P., Billings, B., Olaleye, O., Herculano- Houzel, S. and Manger, P. 2013. The Continuously Growing Central Nervous System of the Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*). *The Anatomical Record*. 296, 10 (2013), 1489–1500.
- Oliveira-Pinto, A., Santos, R., Coutinho, R., Oliveira, L., Santos, G., Alho, A., Leite, R., Farfel, J., Suemoto, C., Grinberg, L., Pasqualucci, C., Jacob-Filho, W. and Lent, R. 2014. Sexual Dimorphism in the Human Olfactory Bulb: Females Have More Neurons and Glial Cells than Males. *PLoS ONE*. 9, 11 (2014), e111733.
- Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R.K., Porteš, M., Tecumseh Fitch, W., Herculano-Houzel, S., Němec, P. (2016) Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v tisku.
- Ribeiro, P., Ventura-Antunes, L., Gabi, M., Mota, B., Grinberg, L., Farfel, J., Ferretti-Rebustini, R., Leite, R., Filho, W. and Herculano-Houzel, S. 2013. The human cerebral cortex is neither one nor many: neuronal distribution reveals two quantitatively different zones in the gray matter, three in the white matter, and explains local variations in cortical folding. *Frontiers in Neuroanatomy*. 7, (2013), 28.
- Sarko, D., Catania, K., Leitch, D., Kaas, J. and Herculano-Houzel, S. 2009. Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in Neuroanatomy*. 3, (2009), 8.
- Young, N., Collins, C. and Kaas, J. 2013. Cell and neuron densities in the primary motor cortex of primates. *Frontiers in neural circuits*. 7, (2013), 30.