

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Veronika Salajková

Pravidla buněčného škálování mozku u psů: Efekt domestikace a miniaturizace psích plemen

Cellular scaling rules for dog brains: Effect of domestication and miniaturization of dog breeds

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Němec, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování: Děkuji přátelům a rodině za podporu při sepisování, a především svým kolegům a školiteli za jejich neocenitelné rady, návrhy, připomínky a trpělivost, bez nichž by realizace této práce nebyla možná.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

OBSAH:

1. ÚVOD	6
1.1. Psovité šelmy	6
1.2. Domestikace psa	7
1.3. Plemena psa.....	9
1.4. Vliv domestikace na mozek	11
1.5. Frakční izotropická homogenizace	12
1.6. Cíle práce	14
2. METODIKA.....	15
2.1. Získaný materiál	15
2.2. Preparace mozků.....	15
2.3. Preparace hlavních částí mozku.....	16
2.4. Řezání koncového mozku	16
2.5. Parcelace koncového mozku.....	17
2.6. Izotropní frakční homogenizace.....	17
2.7. Stanovení počtu buněk.....	18
2.8. Stanovení počtu neuronů	19
2.9. Analýza dat	21
3. VÝSLEDKY.....	22
3.1. Velikost těla, mozku a absolutní počty neuronů.....	27
3.2. Hustoty neuronů	33
3.3. Hustoty nonneuronálních buněk	33
3.4. Relativní velikost struktur mozku.....	35
3.5. Poměr neuronů a nonneuronálních buněk	35
3.6. Struktury koncového mozku	36
4. DISKUZE.....	38
4.1. Technické a datové limity studie.....	38
4.2. Absolutní a relativní velikost mozku	38
4.3. Počty neuronů v celých mozcích	42
4.4. Počty neuronů v hlavních částech mozku.....	42
4.5. Distribuce neuronů v koncovém mozku	45
4.6. Nonneuronální buňky.....	45
4.7. Srovnání s dalšími savci	46
5. ZÁVĚR.....	48
6. REFERENCE	49

ABSTRAKT

Proces domestikace vlka obecného (*Canis lupus*) vyústil do současných více než 350 psích plemen, dokládající enormní fenotypickou plasticitu tohoto druhu odraženou v nesmírné rozmanitosti velikostí, tvarů a behaviorálních profilů dnešních psů. Až 50násobné rozdíly ve velikosti těla přesahují variabilitu ve velikosti těla v rámci celé skupiny Canidae. Rozdíly ve velikosti mozku jsou však o poznání menší, a to přibližně 2,5násobné. Je také dobře známo, že ve srovnání s vlčím předkem mají psi, především malá plemena, zredukovanou velikost mozku. Avšak, dosud nejsou k dispozici srovnávací kvantitativní data o počtech neuronů pro různá psí plemena. V předložené diplomové práci jsem pomocí metody izotropní frakční homogenizace odhadla počty neuronů a gliových buněk u osmi psích plemen a tří druhů divokých psovitých šelem. Při srovnání napříč studovanými psími plemeny jsou rozdíly v počtu neuronů menší než rozdíly ve velikosti mozku – zdá se tedy, že malá plemena kompenzují malé mozky zvýšením neuronální hustoty. Je rovněž zajímavé, že miniaturizace psích plemen je spojena s menší redukcí mozku, než by bylo možno předpokládat na základě škálování velikosti těla a mozku u divokých psovitých šelem a zdá se být spřažena se zvýšením hustoty neuronů. Výsledkem je, že malá psí plemena mají větší mozky a více neuronů než divoké psovité šelmy stejné velikosti. Tato zjištění zpochybňují tradiční názor, že domestikace má silně negativní efekt na velikost mozku a jeho procesní kapacitu.

Klíčová slova: počet neuronů, velikost mozku, domestikace, evoluce, miniaturizace, psovité šelmy.

Abstract

The process of domestication of the grey wolf (*Canis lupus*) resulted in more than 350 dog breeds attesting for an immense phenotypic plasticity of this species, reflected in the enormous variation of sizes, shapes and behavioural profiles of today's dogs. The differences in body size can be 50-fold, which exceeds the body size variation of all recent canids. The differences in brain size are significantly smaller, only about 2.5-fold. It is also well known that, compared to their wolf ancestor, dogs, and especially small breeds, have reduced brain size. However, up till now, no comparative data about neuron numbers in different dog breeds are available. In this thesis, I use the isotropic fractionator to assess number of neurons and glial cells in eight dog breeds and three species of wild canids. When compared across dog breeds analysed, the differences in neuron numbers are lower than the differences in brain size – it seems that small breeds compensate for smaller brains with higher neuronal density. Interestingly, miniaturization of dog breeds is associated with brain size reduction that is smaller than expected from brain-body scaling reported for wild canids and seems to be accompanied by compensatory increase of neuronal density. Thus, brains of small dogs are bigger and harbour more neurons than brains of equivalently sized wild canids. These results challenge the traditional view that domestication have a strong negative effect on brain size and processing capacity.

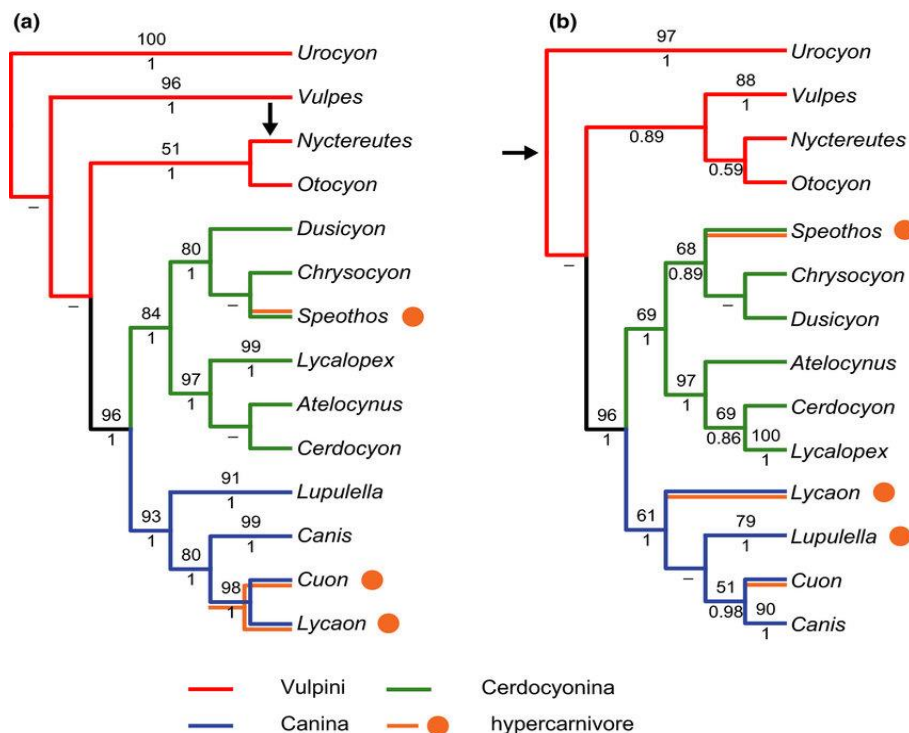
Keywords: number of neurons, brain size, domestication, evolution, miniaturization, canids.

1. ÚVOD

1.1. Psovité šelmy

Fosilní záznamy dokládají, že se první psovitě šelmy vyskytovaly před 37-40 milióny let v neoarktické oblasti (Tedford et al., 2009). Skupina psovitých šelem, dnes zvaná Caninae, vznikla jako sesterská skupina pro skupinu Borophaginae. Obě tato seskupení se vyvinula nejspíše v oligocénu v severní Americe. V pozdním miocénu se psovitě šelmy rozšířily do Euroasie přes Beringovu úžinu (Wang et al., 2008). Po rozšíření psovitých šelem po euroasijském kontinentu pokračovala diversifikace jednotlivých skupin, a to konkrétně na dnes známé rody *Canis*, *Vulpes* a *Urocyon* (Wesley-Hunt, 2005).

V dnešní době je známo 35-40 druhů psovitých šelem, které se vyskytují kosmopolitně, vyjma Antarktidu. Jejich vzájemná příbuznost je téměř vyřešena (Obr. č. 1). Zajímavým unikátem je Austrálie, kam byly psovitě šelmy uměle vysazeny lidmi a následně se ze zdivočelých jedinců v izolaci vyvinul pes dingo (Zubiri, 2009; Wilson & Reeder, 2005). Caninae jsou jediná přeživší skupina z radiace psovitých šelem, obsahuje 13 recentních a 7 vyhynulých rodů (Marshall 1982; Vaughan et al. 2000).



Obrázek č. 1 Fylogeneze současných kanidů založená na analýze všech znaků (A) a molekulárních znaků (B). Převzato ze Zrzavý et al., 2018.

Většina moderních šelem může být vysledována až do doby před 30-35 miliony let, kdy se diferencovaly. Mozky psovitých šelem se v průběhu evoluce rovněž diferencovaly (Radinsky, 1973; Lyras 2009). Nejdůležitějším rozdílem mezi mozky žijících divokých kanidů je jejich relativní velikost a tvar *gyrus proteus* – dlouhý a štíhlý u psů, krátký a široký u lišek (Radinsky, 1973; Lyras 2009). Jedním ze znaků moderních kanidů je také *sulcus crucialis*, který se podle průzkumu latexových endokraniálních odlitků nevyskytoval u jejich společného předka, ale vyvinul se pravděpodobně několikrát nezávisle na sobě (Radinsky, 1971). Během evoluce kanidů došlo k výrazné expanzi neokortexu a rovněž ke zvětšení mozečku, zvláště pak lobu VII. Evoluční expanze neokortexu nebyla rovnoměrná – nejprve došlo ke zvětšení posteriorního a temporálního laloku, teprve později (pozdní miocén) se zvětšil také anteriorní lalok koncového mozku (Radinsky, 1973).

1.2. Domestikace psa

Většina domestikantů má svůj původ v jednom z několika historických domestikačních center, mezi které patří například úrodný půlměsíc na Blízkém východě. Mezi pozoruhodné výjimky domestikace zvířat patří kočky a psi. Obě tyto skupiny byly domestikovány na několika rozličných místech v různých dějinných etapách.

O procesu domestikace psů stále nepanuje jediný ucelený všeobecně přijímaný názor. Existuje několik teorií o tom, z jakého druhu se pes vyvinul. Například Sardella uvádí možnost, že vznikl z již vyhynulého druhu *Canis mosbachensis* (Mezocci et al., 2017). Nejvíce současných autorů však zastává názor, že se pes vyvinul z vlka *Canis lupus* (Sablin, 2002), což se zdá být obhajitelné i na základě výzkumu, dle kterého je genetický rozdíl psa a vlka pouze 0,042 % (Wayne et al., 1991). Tuto hypotézu podporuje také fakt, že je mezi těmito druhy možné křížení.

Vlci, předci psů, byli domestikováni v období před 15 000 lety. Vyplývá to ze změn na kosterních nálezech, jako například redukce velikosti a morfologické rozdíly (Germonpré et al., 2009, 2012). Fosilní nálezy objevené Sablinem (2002) v Eliseevchi, datované do období před 30 000 lety, byly původně chybně označené jako psi. A. G. Drake (2015) však toto určení vyvrátil. Kosterní pozůstatky se vlivem domestikace mění pozvolna, a tak nelze přesně určit, kdy už pes byl domestikovaný, a v kterém případě se ještě jedná o vlka (Kruska 2007).

Soudě dle narůstajících důkazů je možné předpokládat několikanásobnou domestikaci událost v historii vývoje psů. V současnosti je nejvíce pravděpodobná hypotéza tvrdící, že pes byl domestikován v Číně, centrální Asii, západní Eurasii a na blízkém východě nezávisle na sobě v různých historických obdobích (Savolainen 2002).

Lidé se v té době živili především lovem a sběrem plodin. Vždy po vyčerpání zdrojů aktuální lokality byli nuceni měnit svá stanoviště, a tak neustále kočovat (Driscoll et al., 2009). Nezpracované zbytky lidské potravy, které byly zanechány na okraji kočovných táborů, se staly snadno získatelnou potravou pro vlky, kteří se tak vyskytovali v čím dál menších vzdálenostech od lidských obydlí (Coppinger 2001). I lidé blízkosti vlků uměli využít ve svůj prospěch a postupně je využívali k hlídání lidských sídlišť a dětí, ale také jako varování před blížícími se zvířaty, jinými nomádky skupinami a dalšími četnými nebezpečnostmi. Už v mezolitu se soužití lidí a vlků natolik prohloubilo, že byli někteří jedinci využíváni také k lovu a ve válkách (Moody et al., 2006).

Lidé tedy nedomestikovali psy jako domácí mazlíčky a společníky, ale spíše kvůli bezpečnosti tehdejších osad, či úspěšnosti na lovu. Vzájemné sociální pouto člověka a vlka, později psa, se vyvíjelo spíše jako nezamýšlený důsledek jejich oboustranně výhodné spolupráce, spolu s ním se měnil i morfortyp vlka (Pierotti, 2017). Šlo především o zkrácení rostra, povislé uši a ocas, a mnohem variabilnější barvu srsti.

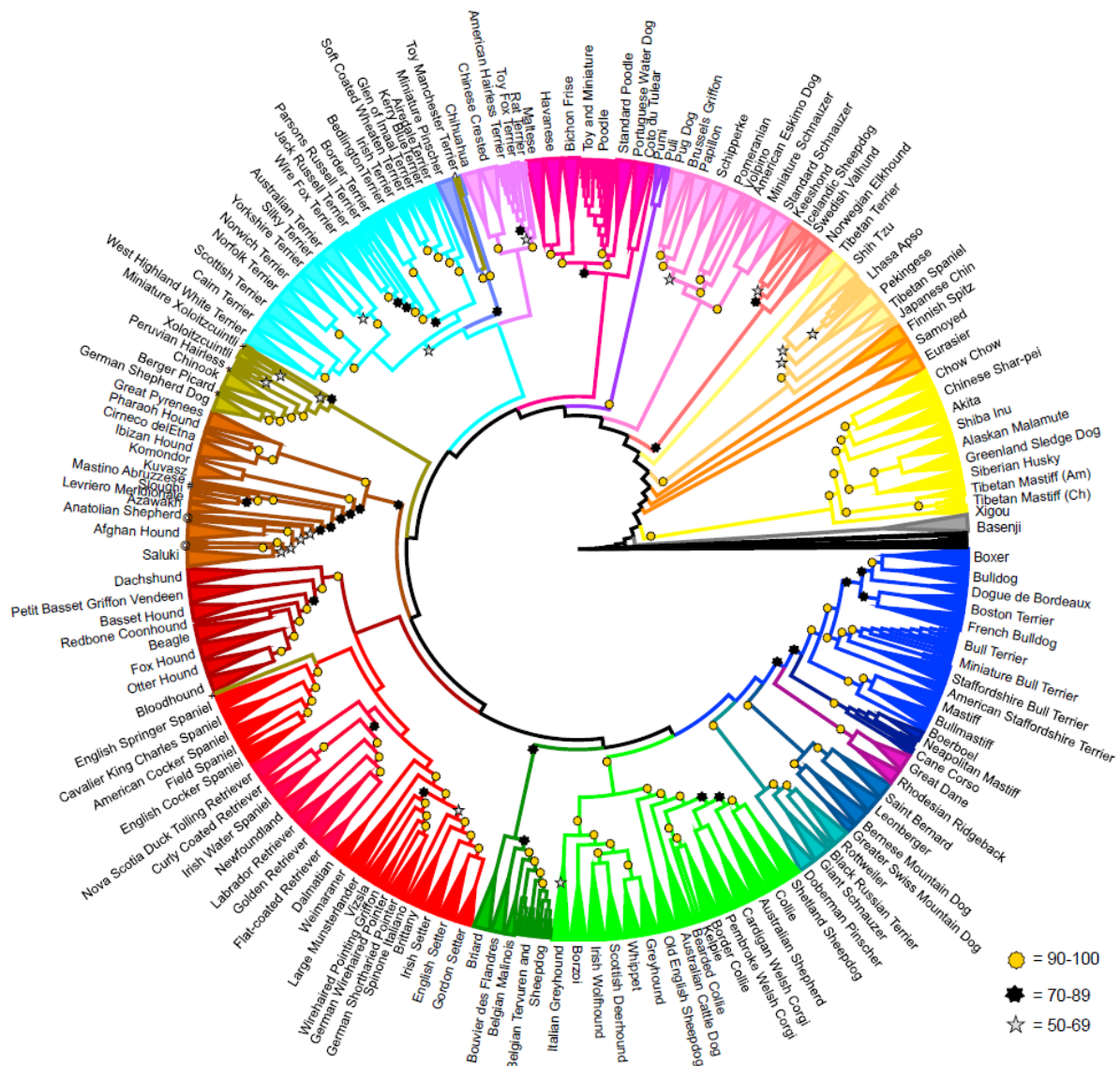
Domestikace ovlivnila vlka a později psa jak po sociální, tak po fenotypové stránce. Pes byl snáze ochočitelny, tj. krotší a poslušnější než jeho divoký předchůdce (Miklósi, 2014). Někteří autoři to přičítají procesu neotenizace (Anderson, Eugene; 2018). S předchozí tezí o psí poslušnosti nesouhlasí například Coppinger. Dle jeho názoru má psí poslušnost a případná neotenie původ již v selekci konkrétních jednotlivců pro domestikaci (Coppinger, 2001).

Všichni domestikanti se vyznačují podobnými změnami, jedná se o takzvaný „domestikační syndrom“, který zahrnuje mimo jiné: depigmentaci srsti, změny v kraniofaciální morfologii, zvýšenou krotkost, infantilní chování a změny v reprodukčním cyklu (Wilkins et al., 2014). Nepřekvapivě obsahují i mozky domestikovaných zvířat podobnosti. Všichni domestikovaní ptáci a savci vykazují vyšší variabilitu ve velikosti jednotlivých regionů mozku a mají menší absolutní velikost mozku než jejich divocí příbuzní (review viz Kruska 2005).

1.3. Plemena psa

Přestože výše uvedené vlastnosti charakterizují většinu dnešních psů, můžeme u jednotlivých plemen psa dnešní doby sledovat silnou diverzifikaci na základě umělé selekce. Plemeno je definováno jak geneticky, tak podle fenotypu (diferenciace barvy srsti, velikosti a tvaru těla, délky nohou nebo tvaru lebky) (Ostrander et al., 2007; Parker et al., 2004). Rozmanitost talentů a fenotypů vedla postupem času k vytvoření mnoha rozličných plemen, z nichž každé poskytovalo nějaké služby - od masa, kožešin až po společnost (Wilcox & Walkowicz, 1995).

Tato selekce, tedy šlechtění, psa natolik diverzifikovalo, že má vyšší variabilitu v morfologii než kterýkoliv jiný živočišný druh (Lindblad-Toh, K., et al., 2005). Mezi selekční tlaky, díky kterým se moderní plemena mohla vyvinout, nepatří jen šlechtění, ale i další mechanismy, například – geografické oddělení, migrace, hybridizace v historii plemen a časová osa formování plemen. Parker se svými společníky zkoumala 161 plemen psů a zjistila, že jsou tvořena různými divizemi a příměsemi, které se liší, jak geografickým původem, tak různými mutacemi. Migrace plemene do nového regionu mění jak psa, který imigroval, tak i psa, který toto prostředí obýval původně. Výsledkem tohoto míšení je téměř 400 plemen moderních psů (<http://www.akc.org>, The Complete Dog Book: 20th Edition Hardcover – January 31, 2006), z nichž každé má jedinečnou historii i genetický profil (Parker et al, 2017).



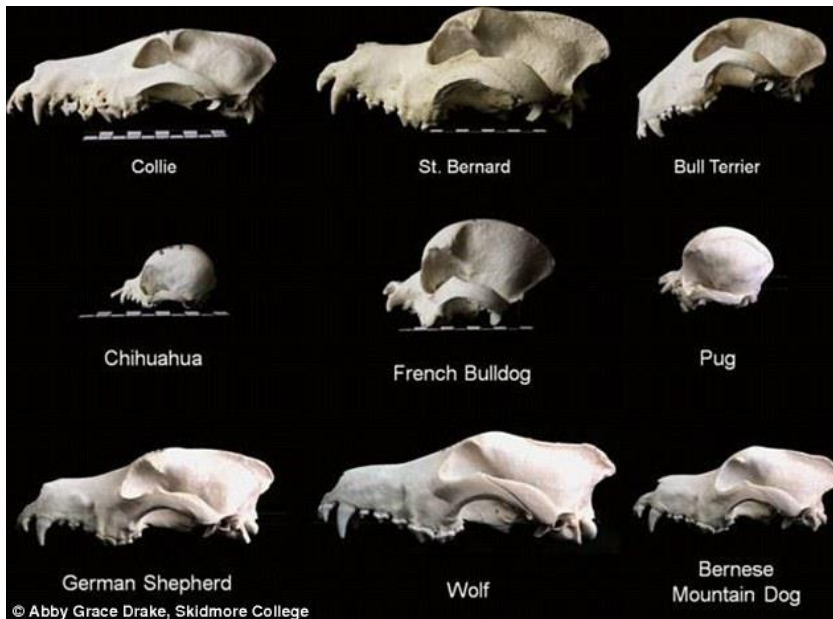
Obrázek č. 3. Kladogram 161 plemen psa domácího. Převzato z Parker et al. (2017).

Je pozoruhodné, že za touto enormní variabilitou stojí jen malé množství genů, například za rozdíly v pigmentaci jsou odpovědné tyto geny: Melanocortin 1 receptor, tyrosinase related protein 1, agouti signal peptide, melanophilin, SILV (Schmutz & Berryere, 2007).

Variabilita ve velikosti těla mezi psy je opravdu extrémně vysoká, rozdíl mezi čivavou a německou dogou může být až 40násobný (Evans, 1993). Podle výzkumu na portugalském vodním psu je za rozdíly ve velikosti plemene zodpovědný lokus chromozomu 15 (CFA15), kde se vyskytují dvě možnosti alel, jedna pro velkého psa, druhá pro malého, je-li pes heterozygot, pes je střední velikosti (Chase et al., 2002). Za sexuální dimorfismus ve velikosti je zodpovědná heterogenita na chromozomu X u samic, heterogenní samice jsou v průměru

větší než samci stejného plemene (Chase et al., 2005). Přes neustálou snahu o pochopení psiho genomu je stále nesnadné určit přesnou mutaci, která je za změnu fenotypu zodpovědná (Boyko, 2009).

Na rozdíl od vlka, jehož lebka má původní rostrálně protáhlý tvar – dolichocephalii, je u některých plemen psů velmi výrazným morfologickým znakem brachycefalie – tedy zkrácení přední části lebky. Jak je patrné z obrázku č. 3, lebky psa se plemeno od plemene liší. Brachycefalie vznikla generacemi selektivního šlechtění.



Obrázek č. 5. Lebky vybraných psích plemen v porovnání s lebkou vlka. Psi s nejvíce brachycefalickými lebkami mají výrazně otočené mozkové hemisféry šikmo ventrálně směrem k přednímu pólu (Roberts, 2010).

1.4. Vliv domestikace na mozek

Efekt domestikace na mozek a jeho části byl studován u mnoha vzájemně nepříbuzných druhů (např. Kruska & Schott, 1977; Leybold, 2000; Kruska & Röhrs, 1974; Schleifenbaum, 1973; Ebinger, 1974; Plogman & Kruska 1990; Kruska, 1996). Pes je však pro tyto studie nejvhodnějším modelem vzhledem k všeobecné vysoké variabilitě.

Původně se velikost mozku měřila jen podle obsahu lebky nebo za pomoci latexových endokraniálních odlitků (Radinsky, 1971), očekávalo se totiž, že velikost mozku je přímo úměrná velikosti lebky. Výsledkem obvykle bylo, že domestikovaná zvířata měla menší mozek než jejich divocí předci. Ale toto porovnání je u domestikovaných zvířat problematické, protože

se s artifiální selekcí zvětšila diverzita tvarů lebek. Rozdíl ve velikosti mozku mezi vlkem a domestikovaným psem je 30 % ve prospěch divokého předka (Kruska, 2007). Zmenšení mozku po domestikaci je odůvodněno hypotézou, že za změněných podmínek v prostředí bez predátorů jsou sníženy funkční nároky na neurální výkon, což posléze umožňuje redukce struktur mozku a přidružených smyslových orgánů (Kruska, 1988).

Současné studie zkoumají, jak byly selektivním výběrem ovlivněny struktury v mozku. Neuroanatomická variace je jasně viditelná napříč plemeny. Není přímo závislá ani na velikosti mozku nebo tvaru lebky. Výsledky potvrzují teorii, že anatomie mozku se u psů signifikantně liší podle lidmi způsobené selekce směřující k určitému typu chování. Významné rozdíly plemene v temperamentu, trénovatelnosti a společenském chování jsou příležitostným pozorovatelem snadno rozpoznatelné a byly také kvantitativně zdokumentovány (viz např. Serpell & Hsu, 2005; Tonoike et al., 2015). Navíc nedávný genetický výzkum naznačuje, že behaviorální znaky jsou ve vysoké míře dědičné (MacLean et al., 2019).

Různé selekční tlaky na různé oblasti mozku vedou k variabilitě velikosti jednotlivých mozkových struktur napříč druhy (Barton & Harvey, 2000; Smaers & Soligo, 2013). Absolutní velikost jednotlivých částí mozku však závisí také na škálování mezi velikostí dané struktury a celkovou velikostí mozku. Například jeden obecný trend mezi savci v evoluci mozku je expanze neokortexu, ke kterému dochází vždy při zvětšení savčího mozku, ale napříč taxony do různé míry též nezávisle na celkové velikosti mozku (Barton, 2012; Whiting & Barton, 2003). Objem neokortexu se zvětšuje hyperallometricky s objemem mozku. Zatímco mozeček a několik dalších mozkových struktur se zvětšuje hypoallometricky s mozkem (Barton, 2012). Zvětšení neokortexu má tedy nepoměrný vliv na objem mozku ve srovnání s mozečkem (Barton & Harvey, 2000; Herculano-Houzel, et al., 2007b). Konkrétně u psa byla změnou po domestikaci nejvíce zasažena centra vizuální. V poměru k ostatním částem mozku se po domestikaci nejvíce zmenšil neokortex. Hippokampus se také významně zmenšil, u pudlů například o celých 40 % (Kruska, 1988).

1.5. Frakční izotropická homogenizace

Srovnávací studie tradičně využívaly ke zkoumání funkční kapacity mozku měření objemu nebo povrchu mozku (Jerison, 1985; Zhang a Sejnowski, 2000). Tento zjednodušující přístup vycházel z předpokladu, že pokud jde o buněčné složení, všechny mozky savců jsou zmenšenými verzemi stejného modelu. Pokud by tomu tak bylo, povrch a objem by

fungovaly jako nepřímé míry počtu gliových buněk a neuronů, který je následně možno použít pro odhad výpočetní kapacity mozku (Ngwenya et al., 2017). Dle současnějších výzkumů se ale zjišťuje, že s mírou inteligence lépe korelují počty kortikálních neuronů a rychlost vedení vzruchů mezi nimi. Izotopická frakcionace je průlomová metoda ke kvantifikaci počtu neuronů, se kterou přišla Suzana Herculano-Houzel a Roberto Lent (2005). Její princip spočívá v tom, že se zvážena struktura zhomogenizuje v suspenzi buněčných jader. Provádí se tak za pomoci homogenizátoru manuálně. Takto získaná volná jádra se následně obarví fluorescenčním markrem DAPI. Jádra se pak počítají v mikroskopu a celkový výsledek se vynásobí celkovým objemem homogenátu. Takto získaný celkový počet jader se opět obarví, ale tentokrát za využití monoklonální protilátky Anti-NeuN a proteinu NeuN, který se váže pouze na gen Fox-3, který je součástí pouze neuronů (Mullen et al., 1992). Studie využívající izotropní frakcionaci odhalily, že pravidla pro škálování buněk mozku jsou rozdílná v různých strukturách jednoho mozku, a dokonce i napříč savčími řády (Sarko, 2009; Gabi et al., 2010). Touto metodou už byli prozkoumáni – hlodavci, hmyzožravci, afrotheria, sudokopytníci, primáti (Herculano-Houzel et al., 2011; Azevedo et al., 2009; Sarko, 2009; Gabi et al., 2010) i některé skupiny ptáků (Olkowicz et al., 2016). Tyto studie se však nevěnují tomu, jaký vliv má domestikace na počet neuronů, a tedy i na funkční kapacitu mozku.

V předkládané studii jsou analyzována plemena psa domácího. Konkrétně tedy počty neuronů a nonneronálních buněk a jak se těmito hustotami liší od divokých psovitých šelem (šakala obecného, lišky obecné, psíka mývalovitého).

1.6. Cíle práce

- 1) Analyzovat buněčné složení mozku u vybraných plemen psa domácího a několika druhů divokých psovitých šelem za použití metody izotropické frakční homogenizace. Konkrétně, stanovit hustoty a absolutní počty neuronů a nonneuronálních buněk v třinácti částech mozku těchto psovitých šelem.
- 2) Stanovit, jak počty neuronů a nonneurálních buněk škálují s velikostí mozku/struktury u studovaných psích plemen.
- 3) Porovnat pravidla buněčného škálování pro psí plemena zjištěná v této studii s tímtež pro mozky dalších savčích skupin (primáti, hmyzožravci, vačnatci, hlodavci).
- 4) Srovnat velikost mozku a počty neuronů u psa s tímtež u divokých psovitých šelem.

2. METODIKA

2.1. Získaný materiál

Psí mozky pro účely této práce se podařilo získat díky spolupráci s Dr. Enikő Kubinyi a MvDr. Kalmanem Czeibertem z Eötvös Loránd University v Maďarsku. Mozky použité v této studii byly vypreparovány z lebek psů, kteří byli po usmrcení se souhlasem majitelů věnování vědě. Psi byli utraceni ze zdravotních důvodů, přičemž byl brán zřetel na zdravotní stav mozku, ale také na věk psa v době jeho usmrcení. Psi příliš vysokého či nízkého věku se nezdáli být pro toto šetření vhodnými kvůli možnosti, že počty jejich neuronů jsou ovlivněny buď nárůstem počtu neuronů v průběhu dospívání, jak bylo prokázáno u myši (Mortera & Herculano-Houzel, 2012), nebo jejich úbytkem v průběhu stáří.

Pro účely této diplomové práce bylo ze získaných vzorků vybráno 12 psích mozků. Jedná se o mozky osmi plemen různých velikostí, konkrétně – komondor, německý ovčák, maďarský ohař, bígl, west highland white teriér, čau čau, jorkšírský teriér a čivava.

Pro srovnání mozků domestikovaných psů (*Canis lupus f. familiaris*) s mozky různě velkých psovitých šelem, jež si klade tato studie za cíl, bylo následně získáno několik mozků divokých kanidů. Mozky lišky obecné (*Vulpes vulpes*) a psíka mývalovitého (*Nyctea procyonoides*) jsme získali v České republice. Vzorek mozku šakala obecného (*Canis aureus*) byl získán z Maďarska na základě spolupráce s Enikő Kubinyi od již výše zmiňovaného Kalmana Czeiberta.

2.2. Preparace mozků

Psům určeným k euthanázii byla veterinářem ve veterinární nemocnici podána sedativa (např. ketamin, xylazin nebo domitor) a po dosažení hluboké sedace jim byla intravenózně podána smrtící látka a to T-61, Euthasol nebo pentobarbital. Následně byli psi dekapitováni a z lebek byly vypreparovány mozky. Z těchto pak byla změřena délka, šířka, výška a váha a byly zaznamenány také doplňující údaje o psu, jako jeho plemeno, váha, či věk v době utracení, naneštěstí výška psů v kohoutku zaznamenána nebyla. Mozky se zamrazily a následně byly fixovány ve 4% roztoku paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (pH=7,4). Fixovány byly po dobu 7–21 dní a během této doby byly převezeny do naší laboratoře v Praze.

2.3. Preparace hlavních částí mozku

Po vyjmutí z fixačního roztoku byly mozky očištěny od mozkových obalů. Všechny mozky byly sagitálním řezem rozděleny na levou a pravou polovinu, přičemž pro izotropní frakční homogenizaci byla využita pouze jedna polovina. Každý mozek byl vyfotografován pro následnou dokumentaci, a to jak ze sagitálního, tak laterálního pohledu. Zpracovávaná polovina mozku byly poté rozdělena na pět částí, a to jmenovitě mozeček, střední mozek, prodloužená mícha, koncový mozek a čichový lalok. Disekce jednotlivých struktur probíhala následovně: **čichový lalok**, pokud byl zachován, byl od zbytku mozku separován řezem v místě napojení olfaktorických traktů ke koncovému mozku. Tato struktura nebyla u všech zvířat zachována, a proto je z analýzy vyjmuta. **Mozeček** byl odpreparován přetětím pedunkulů od povrchu mozkového kmene. **Prodloužená mícha**, zahrnující Varolův most, byla oddělena od středního mozku transversálním řezem vedeným od zářezu u rostrálního konce Varolova mostu ke *commisura posterior*. **Střední mozek**, zahrnující tectum a tegmentum, byl oddělen řezem vedoucím dorsoventrálně mezi *corpus pineale* a *colliculus inferior* ke kaudálnímu konci mamilárního tělesa. Pro uskladnění těchto struktur byla použita nemrznoucí směs, která obsahovala 30 % glycerolu, 30 % ethylenglykolu a 40 % fosfátového pufru. Vzorky byly uskladněny při teplotě -25°C.

2.4. Řezání koncového mozku

Aby bylo možno koncový mozek rozdělit na dobře definované části, bylo nutno jej standardním způsobem nařezat. Za tímto účelem byl koncový mozek zalit do agarózy. Roztok 4% agarózy byl připraven tak, že 24 g agarózy bylo rozpuštěno v 600 ml PBS ve vodní lázni ohřáté na 70°C. Poté, co se agaróza rozpustila v čirý roztok, byla zahřívána ve vodní lázni po dobu cca 30 minut.

Vlastní zalití probíhalo následovně. Jedna preparační miska bez vosku byla naplněna ledem, do ní byla vložena druhá preparační miska a do jejího středu obdélníková forma, která byla rovněž obsypána ledem. Po vychlazení formy bylo její dno zalito agarózou tak, aby hladina dosahovala výšky jednoho centimetru. Poté, co začala agaróza tuhnout, byl na ni opatrně položen mozek sagitální stranou dolů, a to tak, aby byl vodorovně orientovaný. Následně byl zalit další agarózou, tak aby byl zcela ponořen. Dalším krokem bylo přikrytí formy chladícím bločkem, aby následné zatuhnutí trvalo co nejkratší dobu. Po zatuhnutí byl celý blok z formy vyňat, v případě potřeby oříznut na požadovanou velikost, vložen do speciálně k tomuto účelu vytvořené upravené formy, a řezán ve frontální rovině na řezy o tloušťce dvou milimetrů. Řezy

byly fotografovány pomocí stereomikroskopu Olympus SZX 12, skenovány pomocí běžného skeneru a dále skladovány v nemrznoucí směsi.

2.5. Parcelace koncového mozku

Pro orientaci ve frontálních řezech koncovým mozem psů byl použit stereotaktický atlas mozku bígla (Palazzi, 2011) a veterinární učebnice psí neuroanatomie (Uemura, 2015). Na základě makroskopických vodítek byly pomocí mikrochirurgického skalpelu (World Precision Instruments) vypreparovány z řezů následující struktury: neokortex (prefrontální kůra byla oddělena zvlášť), piriformní kůra, striatum, septum, diencephalon (zahrnující *area preoptica*), amygdala, hippokampus a entorhinální kůra. **Prefrontální kůra** byla identifikována jako veškerý neokortex nacházející se rostrálně od *corpus callosum*. **Piriformní kůra** byla oddělena od zbytku řezem vedoucím od *fissura rhinalis* podél trojvrstevné piriformní kůry zasahující až k mediální hraně řezu. **Septum** bylo dorsálně ohraničeno kalózním tělesem a ventrálně byla hranice arbitrárně definována na úrovni *comissura anterior*. **Striatum** bylo definováno hranicemi jednotlivých jader, tj. podél *nucleus caudatus*, *putamen* a *nucleus accumbens*, mediálně pak laterální komorou a septem. **Diencephalon** byl separován od bílé hmoty (*capsula interna*) na laterální straně a zahrnoval také preoptickou oblast, *area preoptica*. **Amygdala** byla na dorsální straně separována od striata, z laterální strany pak ohraničena bílými vlákny *capsula externa*, a na mediální straně byla oddělena od ventrálního hippokampu a optického traktu. **Hippocampus** byl odpreparován společně s fornixem. **Entorhinální kůra** byla na dorsální straně ohraničena hippokampem a amygdalou, laterálně pak před *fissura rhinalis*. **Neokortex** zahrnoval veškeré zbylé části na řezu, po odpreparování výše zmíněných struktur. Tyto části byly následně uloženy v nemrznoucí směsi a skladovány při teplotě -20° C.

2.6. Izotropní frakční homogenizace

Ke stanovení počtu jader byla použita metoda izotropní frakční homogenizace. Tkáň byla manuálně homogenizována tak, že došlo k porušení cytoplazmatické membrány a vylití organel z buňky do roztoku. Pro označení jader byl použit fluorescenční marker DAPI. Následně byl spočítán počet jader v definovaném objemu a zjištěný počet následně přepočítán na celkový objem homogenátu, čímž byl určen celkový počet buněk v analyzované části mozku. Neurony byly značeny pomocí monoklonální protilátky anti-NeuN, která se váže na protein NeuN, jež je produktem genu Fox-3. Tento protein je specifický pouze pro jádra neuronů (Kim et al. 2009). Bohužel se však tímto způsobem nedají označit všechny typy neuronů, protože

na některé specifické typy neuronů NeuN neexprimují, například mitrální buňky v čichovém laloku, Purkyňovy buňky v mozečku nebo retinální fotoreceptorové neurony (Mullen et al., 1992). Vzhledem k tomu, že populace neuronů, které se pomocí použité protilátky nebarví, nejsou početné, je tento marker možno použít k relativně přesnému odhadu celkového počtu neuronů. Poměr mezi neurony a nonneuronálními (gliovými a endotelovými) buňkami byl tedy stanoven jako poměr mezi dvojitě značenými (tj. DAPI a NeuN pozitivními) a DAPI pozitivními buňkami.

2.7. Stanovení počtu buněk

Jednotlivé části mozku byly homogenizovány pomocí skleněných homogenizátorů (Tenbroeck, Wheaton; obrázek č. 4) za použití disociačního roztoku (40 mM roztok citrátu sodného s 1 % Tritonu X-100). V průběhu této manuální činnosti byl v pravidelných intervalech homogenizátor oplachován disociačním roztokem, aby se zabránilo zanechávání buněk na jeho okrajích. Homogenizace byla považována za dokončenou ve chvíli, když už nebyly pouhým okem vidět žádné kousky tkáně. Homogenizace se nesmí vykonávat po příliš dlouhý časový úsek, aby nedošlo k poničení jader. Při konečném přemísťování homogenátu z homogenizátoru do zkumavky byla třeba zvláštní péče při opětovném omytí a vypláchnutí homogenizátoru, aby nedošlo ke ztrátě buněk. Výsledný homogenát byl barven 5 % roztokem DAPI a pozorován s pomocí fluorescenčního mikroskopu (OLYMPUS BX51). Za účelem počítání buněk, byl takto upravený homogenát důkladně zamíchán, pipetou bylo nabráno 10 μ l, které byly umístěny na Neubauerovy počítací komůrky (obrázek č. 5 a 6). Tento postup byl opakován nejméně čtyřikrát. Následně byl z výsledků počítán variační kvocient, přičemž pro vhodnost vzorku bylo třeba, aby jeho hodnota byla méně než 10 %. Celkový počet buněk v celé struktuře byl získán tak, že byl nejprve určen počet jader v mřížce (objem suspenze nad mřížkou v počítací komůrce činil 0,0001 ml), a ten byl následně vynásoben celkovým objemem homogenátu. Tímto způsobem byl stanoven počet buněk v analyzované části mozku.



Obrázek č. 4 Homogenizátor;

<https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/CA/en/Glassware/Homogenizers/PYREX®-Ten-Broeck-Homogenizer-with-Pour-Spout/p/7727-2>

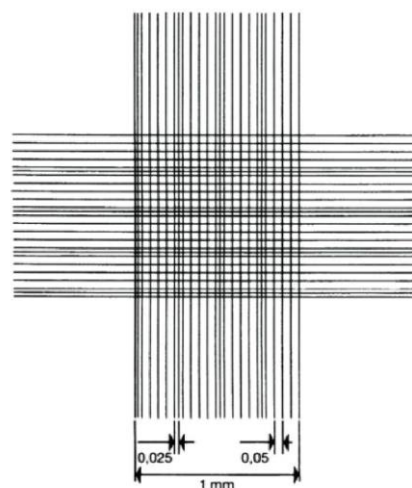
Posléze byl každý vzorek zcentrifugován, supernatant byl odpipetován (tím se docílilo snížení celkového objemu a tím i prostoru potřebného pro uskladnění vzorků), vzorek byl následně doplněn nemrznoucí směsí, resuspendován a uskladněn při teplotě -25°C .

2.8. Stanovení počtu neuronů

Následovalo stanovení počtu neuronů v každé vypreparované části mozku. Bylo tedy z každého vzorku odebráno 200 μl , které byly následně doplněny o 600 μl PBS. Takto upravený vzorek byl promyt následovně, nejprve byl zcentrifugován a odpipetován na supernatant. Po opětovném přidání PBS byl vzorek znovu zcentrifugován. Vzorek byl promyt celkem třikrát. Z takto zpracovaných vzorků bylo odebráno PBS, ale tentokrát již bylo nahrazeno primární protilátkou Anti-NeuN o koncentraci 1 μl na 800 μl vzorku a 40 μl koziho séra na 800 μl vzorku. Přes noc byly vzorky ponechány v chladu a tmě kvůli vhodným podmínkám pro další zpracování. Následující den byl vzorek opět třikrát promyt, přičemž byla přidána 0,5 % příměs Tritonu X-100. Další postup vyžadoval přidání sekundární protilátky Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Life Technologies Corp.) opět v poměru 1:800 vůči konečnému objemu vzorku. Takto pozměněný vzorek byl inkubován po dobu dvou hodin.

Po inkubaci byl vzorek opět třikrát promyt v PBS a následně doplněn takovým objemem, aby měl při dalším počítání pod mikroskopem přiměřenou hustotu jader. Poté již byl pomocí fluorescenčního mikroskopu určen poměr zastoupení nonneurálních buněk (buňky gliové a endotelové) a neuronů. Bylo nutné, aby mikroskop na výpočet tohoto poměru byl

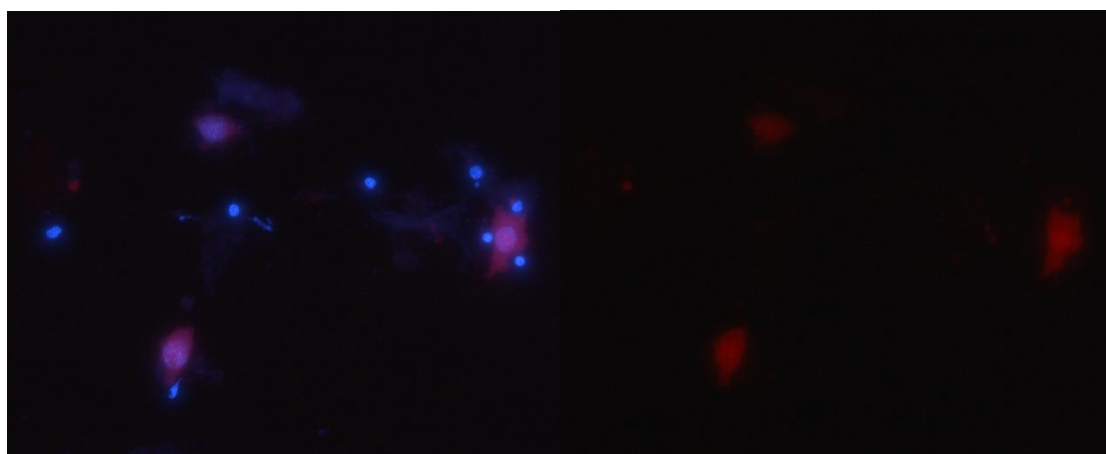
vybaven specifickými filtry (U-MWU2 pro DAPI a U-MWG2 pro Alexa Fluor 546-konjugované sekundární protilátky). Jako neurony byly interpretovány buňky, jejichž jádra reagovala pozitivně, jak na NeuN, tak i na DAPI (obrázek č. 7). Buňky, jejichž jádra byla pozitivní pouze pro DAPI, byly určeny jako buňky nonneurální. Nonneurální buňky nebyly dále rozlišeny, obsahují různé buňky gliové a endotelové.



Obrázek č. 5 Neubauerova komůrka

Obrázek č. 6 Detail mřížky sloužící k definování

<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/> přesného objemu suspenze



Obrázek č. 7 Homogenát z mozku bígla značený DAPI a NeuN a zobrazený ve fluorescenčním mikroskopu. Nalevo modré nonneurální buňky jsou pouze DAPI pozitivní; růžové neurony jsou dvojité značené pomocí DAPI a NeuN (použit duální filtr, jak UV tak červené světlo). Obrázek vpravo pouze neurony (použit U-MWG2 propouštějící jen červené světlo).

2.9. Analýza dat

Všechny statistické analýzy a grafické výstupy byly provedeny v programu R 3.5.1. (R Core Team, 2016). Závisle proměnné byly zlogaritmovány pro dosažení normálního rozdělení. Následně byly použity lineární modely (LM) s OLS regresí (metoda nejmenších čtverců) pro analýzu vztahů mezi velikostí struktur, počtem neuronů a hustotou buněk. Pro porovnání sklonu regresních přímků byla užitá analýza kovariance (ANCOVA). Hladina významnosti (p) byla vždy stanovena na hodnotu $p = 0,05$.

Data o velikosti mozku a těla u divokých psových šelem, použitá po porovnání relativní velikosti mozku u psů a divokých psových šelem, byla získána od Mgr. Zuzany Pavelkové, která je excerpovala z dostupné literatury. Data použitá pro regresní analýzu pro celou skupinu Carnivora byla získána z publikace Jardim-Messeder et al., 2017.

3. VÝSLEDKY

V následujících tabulkách jsou shrnuta získaná data.

Tabulka č. 1. Hmotnost těla, hmotnost mozku, celkový počet neuronů a nonneuronálních buněk v mozku.

Plemeno/Druh	Hmotnost těla (kg)	Hmotnost mozku (g)	Neurony (x10 ⁹)	Nonneuronální buňky (x10 ⁹)
Komondor	48,4	149,3	3,99	8,11
Maďarský ohař	31,5	124,3	4,39	8,91
Německý ovčák	44,4	109	3,53	6,97
Bígl	12,3	88	4,33	6,78
West highland white teriér	9,4	76,7	2,83	5,81
Čau čau	26	69,2	2,61	4,64
Jorkšírský teriér	7,6	61,7	2,64	4,27
Čivava	4	52,1	2,51	3,74
Šakal obecný	9,2	55,6	1,73	3,71
Liška obecná	5,49	41,94	2,11	2,99
Psík mývalovitý	8,545	28,11	1,16	1,76

Psí plemena a divoké psovitě šelmy jsou seřazeny podle hmotnosti mozku a to sestupně.

Tabulka č. 2. Hmotnosti jednotlivých částí analyzovaných mozků

Plemeno/Druh	Medulla oblongata (g)	Mesencephalon (g)	Cerebellum (g)	Olfactory bulb (g)	Telencephalon (g)	Diencephalon (g)
Komondor	11,807	2,101	15,752	1,357	112,690	5,593
Maďarský ohař	7,513	3,750	11,189	2,972	93,435	5,440
Německý ovčák	7,740	1,780	9,752	2,738	81,331	5,658
Bígl	5,515	2,746	10,938	2,521	62,772	3,508
West highland white teriér	5,249	2,448	7,342	1,457	56,591	3,613
Čau čau	7,207	0,806	7,820	1,328	48,777	3,261
Jorkšírský teriér	3,502	1,547	6,063	1,033	46,675	2,881
Čivava	3,141	0,876	5,060	0,752	39,429	2,841
Šakal obecný	3,505	0,993	4,970	1,926	41,449	2,758
Liška obecná	2,778	0,915	4,823	1,948	29,770	1,707
Psík mývalovitý	1,749	1,064	3,260	1,419	19,028	1,590

Tabulka č. 3. Počty neuronů v jednotlivých částech mozků

Plemeno/Druh	Medulla oblongata (x 10 ⁶)	Mesencephalon (x 10 ⁶)	Cerebellum (x 10 ⁶)	Olfactory bulb (x 10 ⁶)	Telencephalon (x 10 ⁶)	Diencephalon (x 10 ⁶)
Komondor	15,76	15,38	2 911,87	75,02	1 023,44	27,21
Maďarský ohař	28,71	25,64	3 413,10	64,48	902,05	24,96
Německý ovčák	20,22	11,45	2 453,84	140,48	1 015,83	29,59
Bígl	21,48	19,38	3 222,18	166,46	1 041,52	28,25
West hightland white teriér	26,41	16,47	2 187,38	132,34	572,61	23,49
Čau čau	15,42	7,64	1 969,45	57,19	599,21	16,35
Jorkšírský teriér	15,84	15,87	1 811,24	106,93	769,09	23,62
Čivava	15,90	11,42	1 818,77	72,31	642,89	25,56
Šakal obecný	11,31	7,77	1 218,15	25,39	476,31	21,26
Liška obecná	7,90	9,55	1 640,53	122,96	438,60	12,51
Psík mývalovitý	6,97	8,76	844,74	110,26	291,23	12,72

Tabulka č. 4. Počty nonneuronálních buněk v jednotlivých částech mozku

Plemeno/Druh	Medulla oblongata (x 10 ⁶)	Mesencephalon (x 10 ⁶)	Cerebellum (x 10 ⁶)	Olfactory bulb (x 10 ⁶)	Telencephalon (x 10 ⁶)	Diencephalon (x 10 ⁶)
Komondor	561,57	106,42	1 473,47	170,14	5 635,04	330,84
Maďarský ohař	557,29	320,86	990,90	501,12	6 584,05	455,04
Německý ovčák	461,28	126,55	862,16	285,22	5 099,08	418,81
Bígl	433,52	208,62	989,82	264,79	4 807,74	336,25
West hightland white teriér	350,89	236,93	882,63	184,26	4 072,07	266,53
Čau čau	319,86	62,44	674,11	157,81	3 327,84	258,40
Jorkšírský teriér	244,80	130,28	552,76	104,39	3 127,84	213,61
Čivava	208,10	78,48	549,42	74,06	2 664,59	240,69
Šakal obecný	206,19	70,68	441,45	263,11	2 764,80	225,99
Liška obecná	205,70	69,35	402,47	187,54	2 189,21	123,49
Psík mývalovitý	98,59	69,47	238,26	105,94	1 234,80	114,78

Tabulka č. 5. Pravidla buněčného škálování pro mozky psů

Závislá proměnná	Vysvětlující proměnná	Mocnná funkce	r ²	p hodnota (exponent)	95% konfidenční interval
M _{BR}	M _{BO}	$M_{BR} = 3.001 \times M_{BO}^{0.345}$	0.707	<0.01	0.145 - 0.545
N _{BR}	M _{BR}	$N_{BR} = 2716 \times 10^5 \times M_{BR}^{0.558}$	0.668	<0.01	0.207 - 0.901
N _{TCT}	M _{TCT}	$N_{TCT} = 101 \times 10^5 \times M_{TCT}^{0.625}$	0.795	<0.01	0.337 - 0.914
N _{CB}	M _{CB}	$N_{CB} = 6638 \times 10^5 \times M_{CB}^{0.594}$	0.695	<0.01	0.241 - 0.947
G _{BR}	M _{BR}	$G_{BR} = 1482 \times 10^5 \times M_{BR}^{0.826}$	0.899	<0.001	0.572 - 1.081
G _{TEL}	M _{TEL}	$G_{TEL} = 1486 \times 10^5 \times M_{TEL}^{0.805}$	0.866	<0.001	0.516 - 1.096
G _{DIE}	M _{DIE}	$G_{DIE} = 1024 \times 10^5 \times M_{DIE}^{0.795}$	0.739	<0.01	0.369 - 1.222
G _{TCT}	M _{TCT}	$G_{TCT} = 788 \times 10^5 \times M_{TCT}^{0.976}$	0.855	<0.001	0.608 - 1.344
G _{CB}	M _{CB}	$G_{CB} = 1293 \times 10^5 \times M_{CB}^{0.859}$	0.882	<0.001	0.571 - 1.146
G _{MO}	M _{MO}	$G_{MO} = 990 \times 10^5 \times M_{MO}^{0.74}$	0.745	<0.01	0.349 - 1.132

M – hmotnost; N – počet neuronů; G – počet nonneuronálních buněk; BR – mozek; TEL – telencephalon; TCT – střední mozek; DIE – mezimozek; CB – mozeček. r² – koeficient determinace vypočítaný z regresní přímky. Data pro některé struktury jsou z tabulky vynechána a to z toho důvodu, že nebyla signifikantní.

Tabulka č. 6. Hmotnost analyzovaných struktur koncového mozku

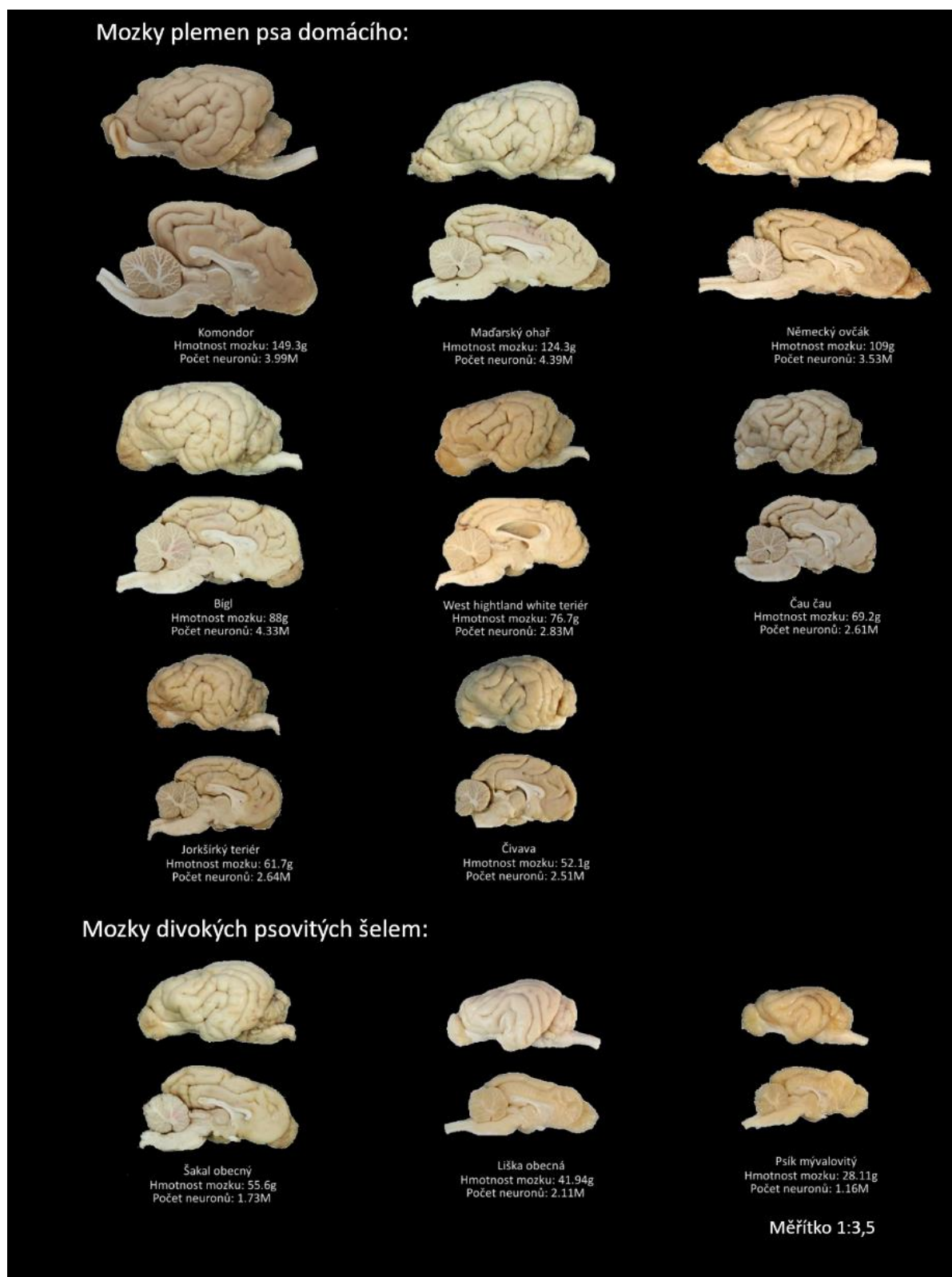
Plemeno/Druh	Neokortex (g)	Prefrontální kortex (g)	Striatum (g)	Hippocampus (g)	Piriformní kortex (g)	Amygdala (g)	Entorhinální kortex (g)	Septum (g)
Komondor	97,75	13,69	5,91	3,77	2,35	1,33	1,17	0,41
Maďarský ohař	81,3	10,20	4,95	3,84	1,41	0,86	0,58	0,50
Německý ovčák	70,37	7,89	3,92	3,21	1,54	1,06	0,81	0,42
Bígl	53,11	10,95	3,36	3,00	1,28	1,06	0,60	0,36
West highland white teriér	46,56	7,64	3,93	2,64	1,64	1,12	0,45	0,25
Čau čau	39,74	6,24	2,78	2,48	1,42	1,52	0,59	0,26
Jorkširský teriér	38,74	7,82	3,22	2,04	1,24	0,69	0,46	0,29
Čivava	32,48	5,87	2,71	1,99	0,93	0,71	0,43	0,19
Šakal obecný	34,88	5,03	1,76	2,14	1,46	0,74	0,34	0,13
Liška obecná	24,41	3,70	1,93	1,47	0,96	0,38	0,37	0,24
Psík mývalovitý	15,53	3,01	1,10	1,15	0,62	0,28	0,20	0,14

Tabulka č. 7. Počty neuronů v analyzovaných strukturách koncového mozku

Plemeno/Druh	Prefrontální			Hippocampus (x 10 ⁶)	Piriformní		Entorhinální	
	Neokortex (x 10 ⁶)	kortex (x 10 ⁶)	Striatum (x 10 ⁶)		kortex (x 10 ⁶)	Amygdala (x 10 ⁶)	kortex (x 10 ⁶)	Septum (x 10 ⁶)
Komondor	883,38	116,30	34,43	14,80	73,06	8,38	6,16	3,23
Maďarský ohař	725,76	114,86	46,09	35,81	81,28	5,49	3,96	3,65
Německý ovčák	885,46	75,78	46,04	22,98	48,50	5,74	4,46	2,66
Bígl	844,41	151,54	29,83	34,32	118,27	8,16	4,24	2,29
West hightland white teriér	440,16	80,46	30,18	20,00	69,91	6,99	3,33	2,04
Čau čau	471,5	82,44	29,80	21,71	57,90	12,98	3,66	1,67
Jorkšírský teriér	572,14	105,50	28,65	24,93	130,70	6,96	4,15	1,57
Čivava	513,33	75,28	23,21	18,38	74,81	7,45	3,74	1,97
Šakal obecný	393,62	46,70	16,06	18,91	37,19	4,10	5,39	1,03
Liška obecná	355,01	58,11	21,60	17,79	34,53	2,33	4,62	2,71
Psík mývalovitý	240,18	25,91	16,02	10,02	16,85	2,70	3,90	1,56

Tabulka č. 8. Počty nonneuronálních buněk v analyzovaných strukturách koncového mozku

Plemeno/Druh	Prefrontální			Hippocampus (x 10 ⁶)	Piriformní		Entorhinální	
	Neokortex (x 10 ⁶)	kortex (x 10 ⁶)	Striatum (x 10 ⁶)		kortex (x 10 ⁶)	Amygdala (x 10 ⁶)	kortex (x 10 ⁶)	Septum (x 10 ⁶)
Komondor	2029,37	256,45	161,22	87,95	40,74	19,94	16,15	7,32
Maďarský ohař	2544,25	326,90	167,31	115,94	15,37	21,41	10,36	14,24
Německý ovčák	1776,89	176,82	128,34	94,27	43,30	21,85	12,96	9,91
Bígl	1679,71	310,46	134,05	100,80	34,87	25,56	9,53	10,02
West hightland white teriér	1524,6	249,30	121,47	83,10	40,09	16,77	10,10	8,59
Čau čau	1173,35	162,91	96,46	58,09	32,40	35,47	7,49	6,21
Jorkšírský teriér	1070,23	201,37	103,97	52,43	27,68	16,63	7,75	7,05
Čivava	874,65	162,95	80,39	61,52	5,13	18,61	9,44	6,20
Šakal obecný	982,66	116,58	59,69	47,69	90,31	13,90	10,34	3,42
Liška obecná	752,89	92,04	61,09	38,87	28,47	8,86	8,32	8,31
Psík mývalovitý	369,7	87,97	35,80	35,61	42,55	5,88	7,43	4,52

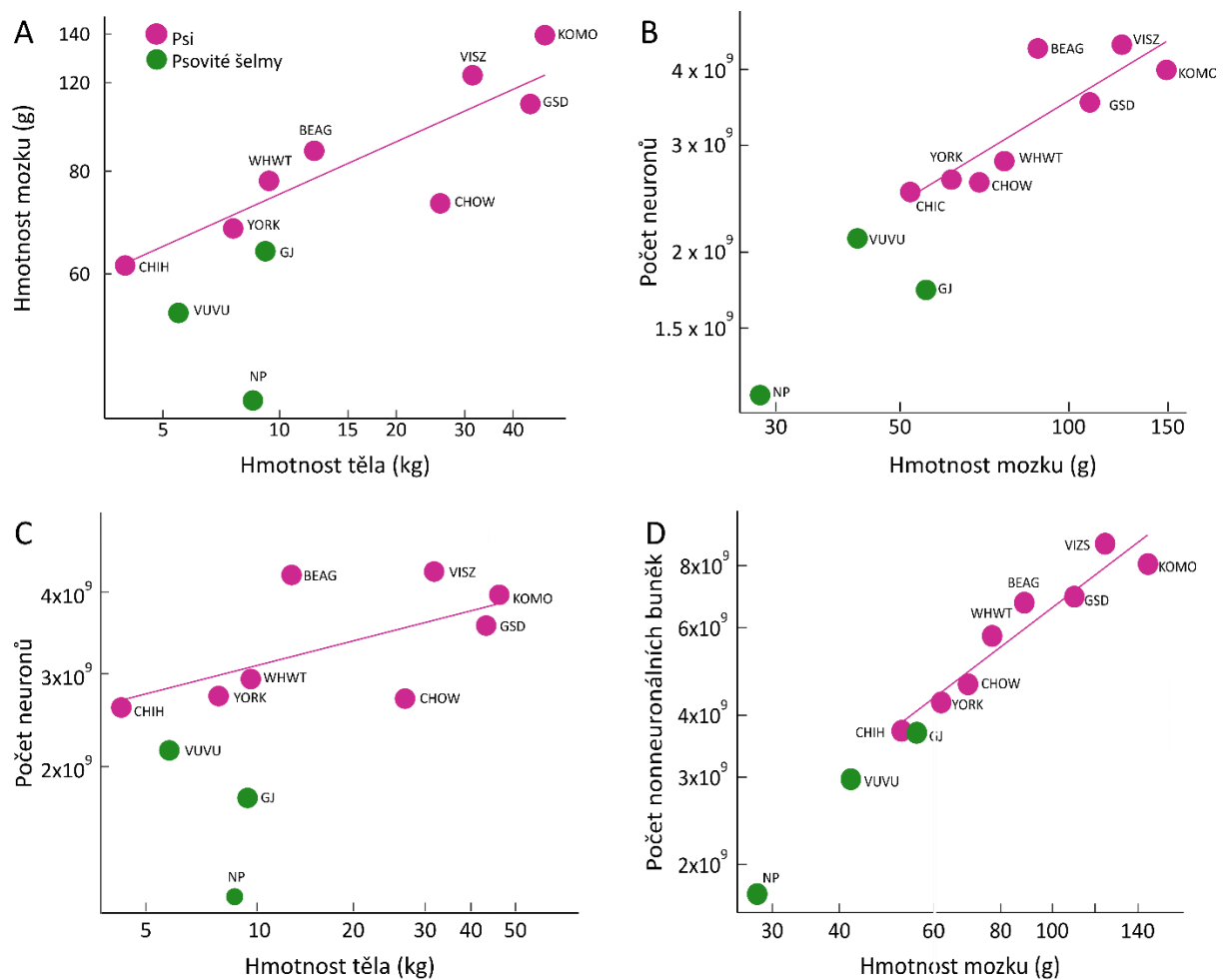


Obrázek č. 8. Porovnání mozků studovaných psů a divokých psových šelem.

3.1. Velikost těla, mozku a absolutní počty neuronů

V této studii bylo porovnáno osm plemen domácích psů se třemi druhy divokých psovitých šelem. Jedinci byli vybráni tak, aby se lišili hmotností těla. Nejnižší hmotnost má čivava a to 4 kg a nejvyšší komondor, jehož hmotnost je 48,4 kg, rozdíl v hmotnosti těla u námi zpracovaných plemen je tedy více než dvanáctinásobný. Celkové počty neuronů u psa se pohybují od 2,51 miliard u čivavy až po 4,39 miliard u maďarského ohaře, což je rozdíl menší než dvojnásobný. U námi analyzovaných divokých psovitých šelem se počet neuronů pohybuje od 1,16 miliardy u psíka mývalovitého po 2,11 miliardy u lišky obecné.

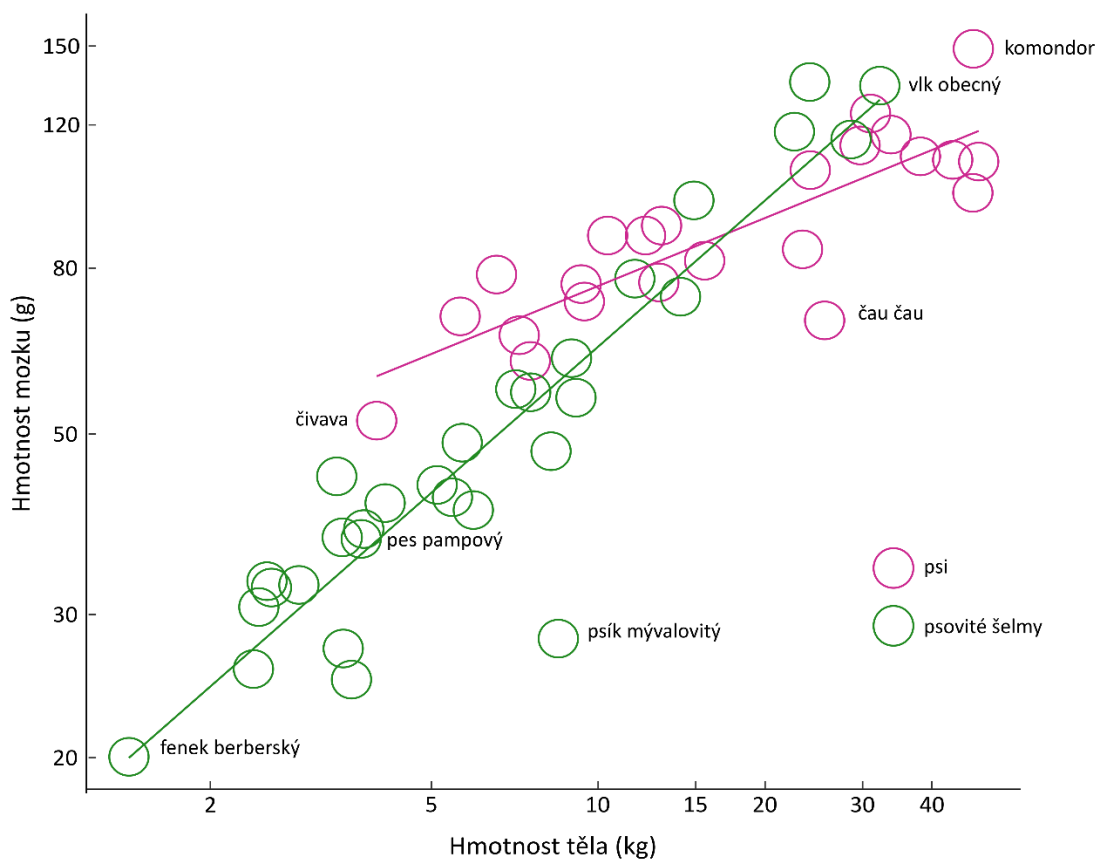
Pravidla škálování



Obrázek č. 9. Pravidla buněčného škálování mozku pro různá plemena psa domácího v porovnání s druhy divokých psovitých šelem. (A) Graf znázorňující vztah mezi hmotností mozku a hmotností těla. (B) Vztah mezi hmotností mozku a počtem neuronů. (C) Vztah mezi hmotností těla a počtem neuronů. (D) Vztah mezi hmotností mozku a počtem nonneuronálních buněk.

Zkratky pro jednotlivá zvířata: BEAG, bígl; CHIC, čivava; CHOW, čau čau; GJ, šakal obecný; GSD, německý ovčák; KOMO, komondor; NP, psík mývalovitý; VISZ, maďarský ohař – vizsla; VUVU, liška obecná; WHWT, west highland white teriér; YORK, jorkšířský teriér.

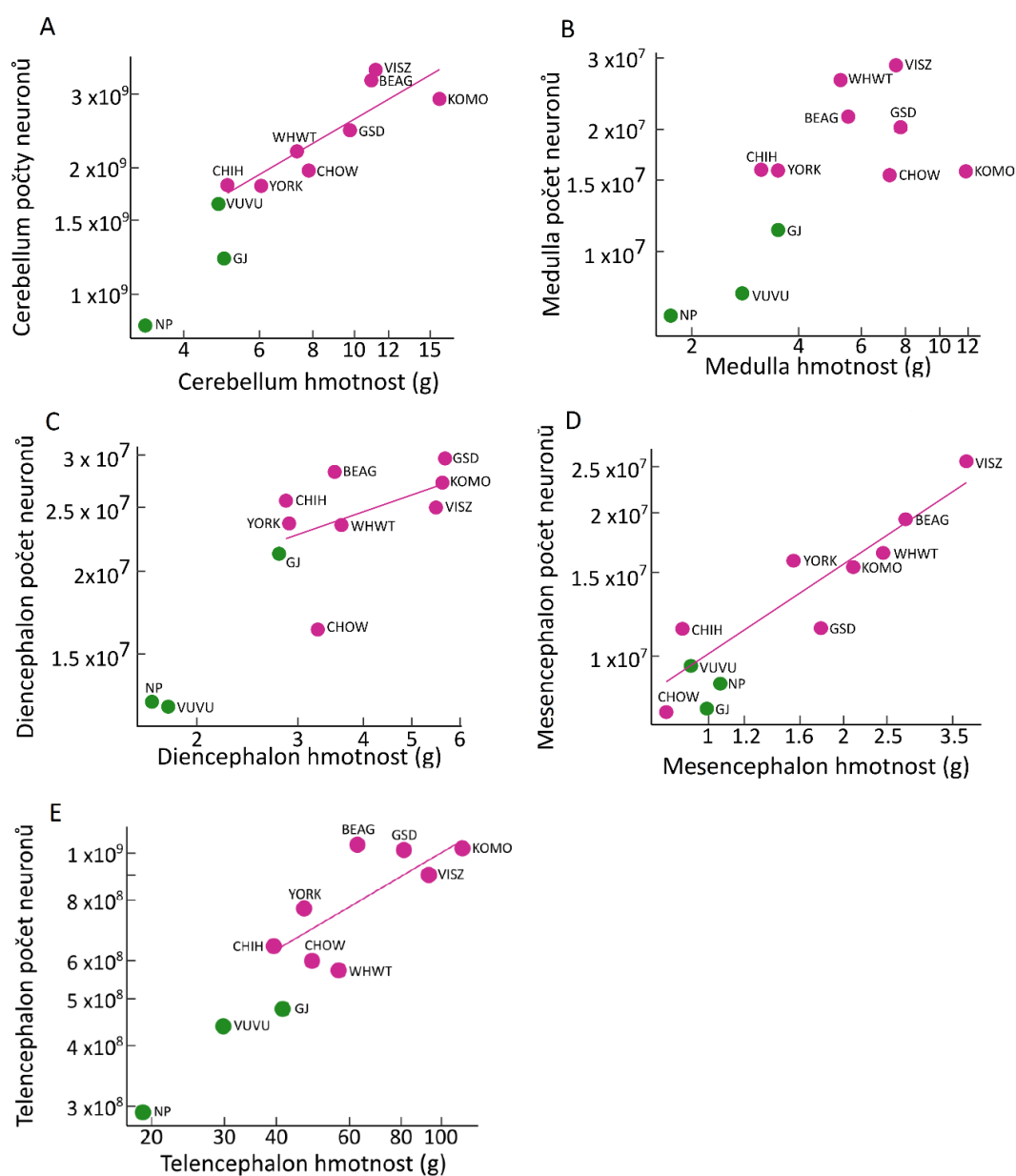
Relativní velikost mozku je odvozena z alometrického vztahu mezi hmotností těla a hmotností mozku. U našich psovitých šelem lze vztah mezi velikostí těla a velikostí mozku vysvětlit mocninou funkcí ($M_{BR} = 3.001 \times M_{BO}^{0.345}$; viz obr. 9A). Počet neuronů v mozku se zvětšuje spolu s jeho hmotností, platí zde pozitivní alometrie ($N_{BR} = 271573256.47 \times M_{BR}^{0.558}$). Mezi hmotností těla a počtem neuronů je korelace slabší. Psi mají překvapivě více neuronů než stejně velké psovité šelmy, a to jak v porovnání s hmotností mozku, tak i s tělesnou hmotností (Obrázek č. 9 B, C). Malá psí plemena mají vyšší encefalizaci. Například hmotnost mozku čivavy je srovnatelná s mozkem šakala obecného, šakal má o 3,5 g těžší mozek. Navíc mají psi vyšší neuronální hustoty, a tedy i absolutní počty neuronů než analyzované psovité šelmy. Například šakal obecný má v mozku 1,73 miliardy neuronů, čivava 2,51 miliardy neuronů. Čivava má tedy o dvě pětiny vyšší počet neuronů. Naopak při porovnání počtu nonneuronálních buněk s hmotností mozku není patrný žádný rozdíl mezi analyzovanými psovitými šelmami a domestikovanými psy (obrázek č. 9 D). Zdá se tedy, že počty nonneuronálních buněk škálují s velikostí mozku u domestikovaných a divokých psovitých šelem stejně. Tento fakt bude však třeba ověřit po zařazení většího počtu divokých psovitých šelem do analýzy.



Obrázek č. 10. Vztah velikosti mozku a těla, srovnání psích plemen s divokými psovitými šelmami. Doplněno o data z literatury excerpovaná Mgr. Zuzanou Pavelkovou.

Rozdíly v relativní velikosti mozku mezi divokých psovitými šelmami a jednotlivými plemeny psa domácího se významně liší. Jak se dalo očekávat pro vnitrodruhovou alometrii, regresní přímka (obrázek č.10) u domestikovaného psa má nižší sklon než totéž u divokých psovitých šelem. Obě regresní přímky se kříží, malá plemena psa domácího tedy mají výrazně větší mozek než stejně velcí zástupci divokých psovitých šelem (obrázek č.10). Například čivava a pes pampový (*Lycalopex (Dusicyon) gymnocercus*), se v hmotnosti těla liší minimálně, mají oba 4 kg, zatímco v hmotnosti mozku se liší významně – mozek čivavy má hmotnost 52,1 g, zatímco pes pampový pouhých 41,2 g, čivava má tedy mozek větší o cca 1/5. Na druhé straně vlk obecný (*Canis lupus*), předek domestikovaných psů, všechna plemena psa domácího z naší studie velikostí mozku překonává. Výjimku zdánlivě tvoří komondor, který má však větší mozek než průměrně velký vlk (data pro psovitě šelmy jsou v Obrázku č. 11 pro jednotlivé druhy jsou zprůměrovaná). Nejtěžší z vlků vážil 48,5 kg a jeho mozek vážil 156,5 g, když ho porovnáme s komondorem, jehož tělo má hmotnost 48,4 kg a mozek 149,3g, je z toho patrné, že stejně těžký komondor má oproti vlkovi obecnému o 5 % menší mozek. Vlk obecný

s nejnižší váhou těla má 19,5 kg a hmotnost jeho mozku je 111 g v porovnání s psem domácím plemene kolie, který má hmotnost těla 23,71 kg (tedy vyšší o 18,2 %) a jeho mozek váží 84,63 g; je jasné, že je mozek vlka větší, a to o 24,2 %. Psík mývalovitý má výrazně menší mozek než jiné psovitě šelmy se stejnou hmotností těla.

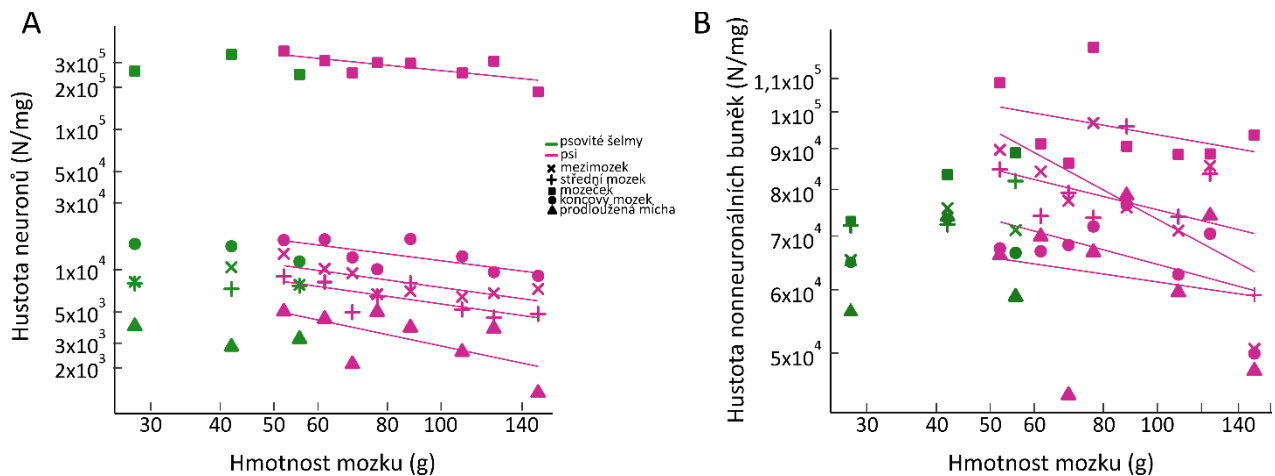


Obrázek č. 11. Vztahy mezi hmotnostmi a počtem neuronů pro jednotlivé analyzované struktury – mozeček (A), prodloužená mícha (B), mezimozek (C), střední mozek (D) a koncový mozek (E). Porovnání mezi plemeny psa domácího **fialově** a zpracovanými divokými šelmami **zeleně**.

Zkratky pro jednotlivá zvířata: BEAG, bígl; CHIC, čivava; CHOW, čau čau; GJ, šakal obecný; GSD, německý ovčák; KOMO, komondor; NP, psík mývalovitý; VISZ, maďarský ohař – vizsla; VUVU, liška obecná; WHWT, west highland white teriér; YORK, jorkširský teriér.

Z mých dat vyplývá, že se jednotlivé analyzované části mozku od sebe výrazně liší jak hmotností, tak i počtem neuronů v nich obsažených. Největší podíl neuronů je soustředěn v mozečku a to od 1,8 miliardy u jorkširského teriéra po 2,9 miliardy u komondora (obrázek č. 11 A; $N_{CB} = 6638 \times 10^5 \times M_{CB}^{0.594}$). Druhá struktura s největším obsahem neuronů je koncový mozek, neurony v něm se pohybují v rozmezí od 570 milionů u west highland white teriéra po 1,04 miliardy u bigla. Další strukturou v pořadí, co do počtu neuronů, je mezimozek. Hodnoty neuronů v něm se pohybují od 16,3 milionů u plemene čau čau po 29,6 milionů u německého ovčáka. Jak je zřejmé z obrázku č. 11 C, čau čau je v tomto směru naprostý outlier, neboť počet neuronů v jeho mezimozku je mnohem nižší, než by odpovídalo hmotnosti této struktury. V prodloužené míše se počty neuronů pohybují od 15,4 milionů u plemene čau čau po 28,7 milionů u maďarského ohaře. Je poměrně překvapivé, že počet neuronů signifikantně nekoreluje s velikostí prodloužené míchy (obrázek č. 11 B). Ve středním mozku se počet neuronů pohybuje mezi 7,6 milionů neuronů u plemene čau čau po 25,6 milionů neuronů u maďarského ohaře, korelace mezi velikostí struktury a počtem neuronů velmi těsná (obrázek č. 11 D; $N_{TCT} = 101 \times 10^5 \times M_{TCT}^{0.625}$).

Omezený dataset mi nedovolil analyzovat škálování mezi velikostí jednotlivých částí mozku a počtem neuronů u divokých psovitých šelem.



Obrázek č. 12. Hustoty neuronů (A) a nonneurálních buněk (B) porovnané mezi jednotlivými analyzovanými částmi mozku a mezi psy a divokými psovitými šelmami.

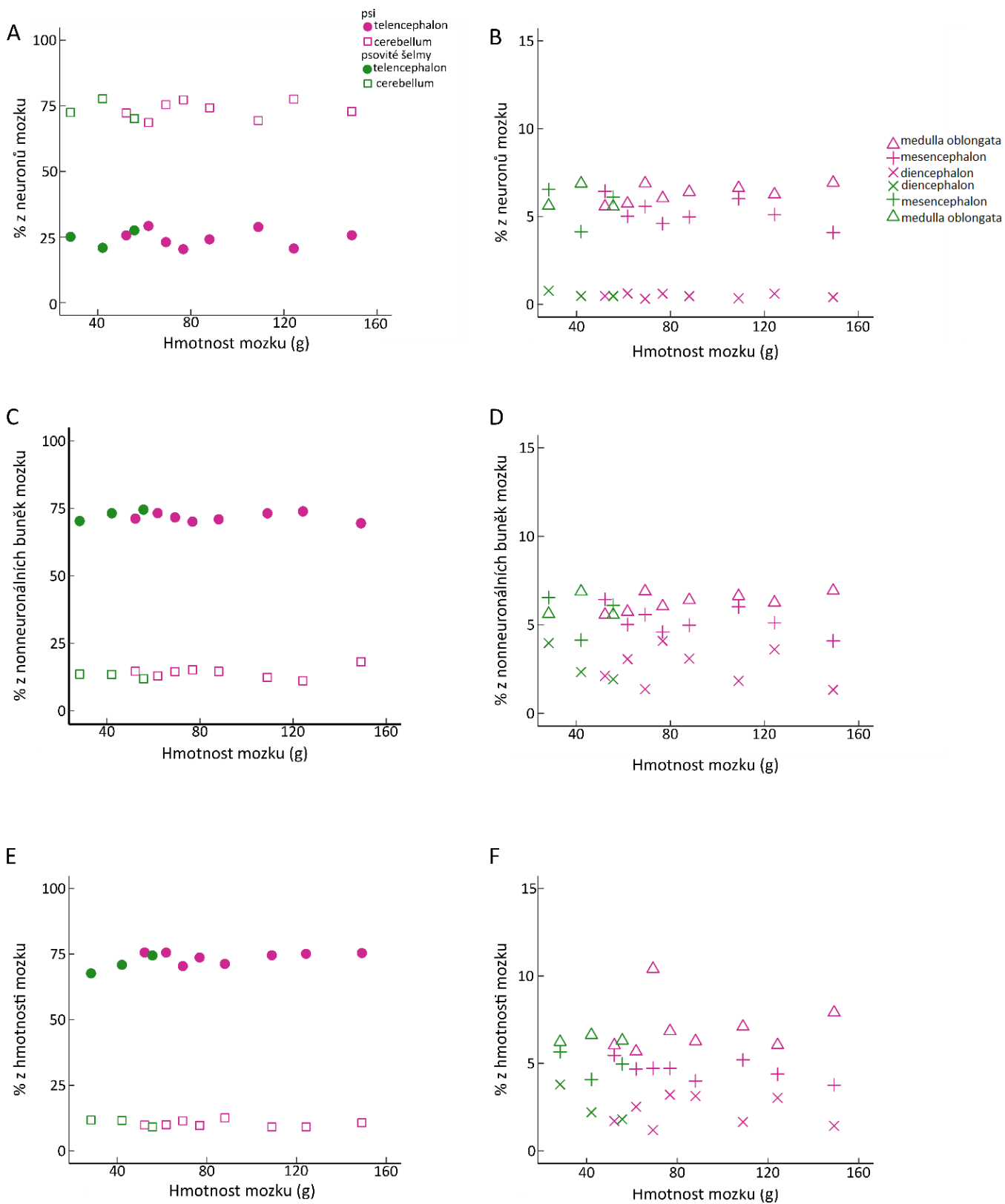
3.2. Hustoty neuronů

Hustoty neuronů obecně negativně korelovaly s velikostí mozku a těla analyzovaných psů (Obrázek č. 12 A). Tento vztah nebyl příliš silný a pozorovali jsme některé výjimky. Nicméně, vzhledem k tomu, že jsme analyzovali jen jeden mozek na plemeno, nelze zatím soudit, zda jsou tyto výjimky charakteristikou plemene, nebo odrážejí individuální, případně věkovou variabilitu. U mnou analyzovaných psových šelem nebyla negativní korelace velikosti mozku/struktury patrná, to je však velmi pravděpodobně dáno limitovanou velikostí studovaného vzorku.

Hustoty neuronů se velmi liší i v jednotlivých analyzovaných částech mozku (Obrázek č. 12 A). Podobně jako je tomu u jiných savců (Herculano-Houzel et al., 2015) a u ptáků (Olkowicz et. al., 2016), jsou nejvyšší hustoty neuronů v mozečku. Tyto hustoty se pohybovaly od 222 milionů N/g u komondora po 375 milionů N/g u čivavy. Naopak nejnižší hustoty jsem pozorovala v prodloužené míše, ta se pohybovala od 1,6 milionů N/g u komondora až po 5,29 milionů N/g u čivavy. Neuronální hustota v koncovém mozku se pohybuje od 10 milionů N/g u west highland white teriéra až po 17 milionů N/g u čivavy. Střední mozek má hustoty neuronů od 6,6 milionů N/g u west highland white teriéra až po 13,6 milionů N/g u čivavy. Z mnou studovaných divokých psových šelem má hustotu neuronů v mozečku nejvyšší liška obecná 389 milionů N/g a nejnižší šakal obecný 256 milionů N/g. V prodloužené míše dosahuje hustota neuronů hodnot od 1,7 milionů N/g u psíka mývalovitého po 3,37 milionů N/g u šakala obecného.

3.3. Hustoty nonneuronálních buněk

Nonneuronální buňky mají ve většině struktur podobné hustoty, a to jak napříč analyzovanými strukturami, tak napříč analyzovanými druhy psových šelem i plemeny psů (Obr. č. 12 B). Nejvyšší hustotu nonneuronálních buněk jsem pozorovala v mozečku, tyto se pohybovaly od 88 milionů NonN/g u bigla po 119 milionů NonN/g u west highland white teriéra ($G_{CB} = 1293 \times 10^5 \times M_{CB}^{0.859}$). V koncovém mozku se hustota pohybovala od 60 milionů NonN/g u komondora po 80 milionů NonN/g u plemena čaučau ($G_{TEL} = 1486 \times 10^5 \times M_{TEL}^{0.805}$). Pro divoké psovité šelmy se hustoty nonneuronálních buněk pohybují v mozečku od 75 milionů NonN/g u psíka mývalovitého po 95,5 milionů NonN/g u lišky obecné. Nejnižší hustoty v koncovém mozku má opět psík mývalovitý a sice 67 milionů NonN/g, a nejvyšší liška obecná 84 milionů NonN/g.



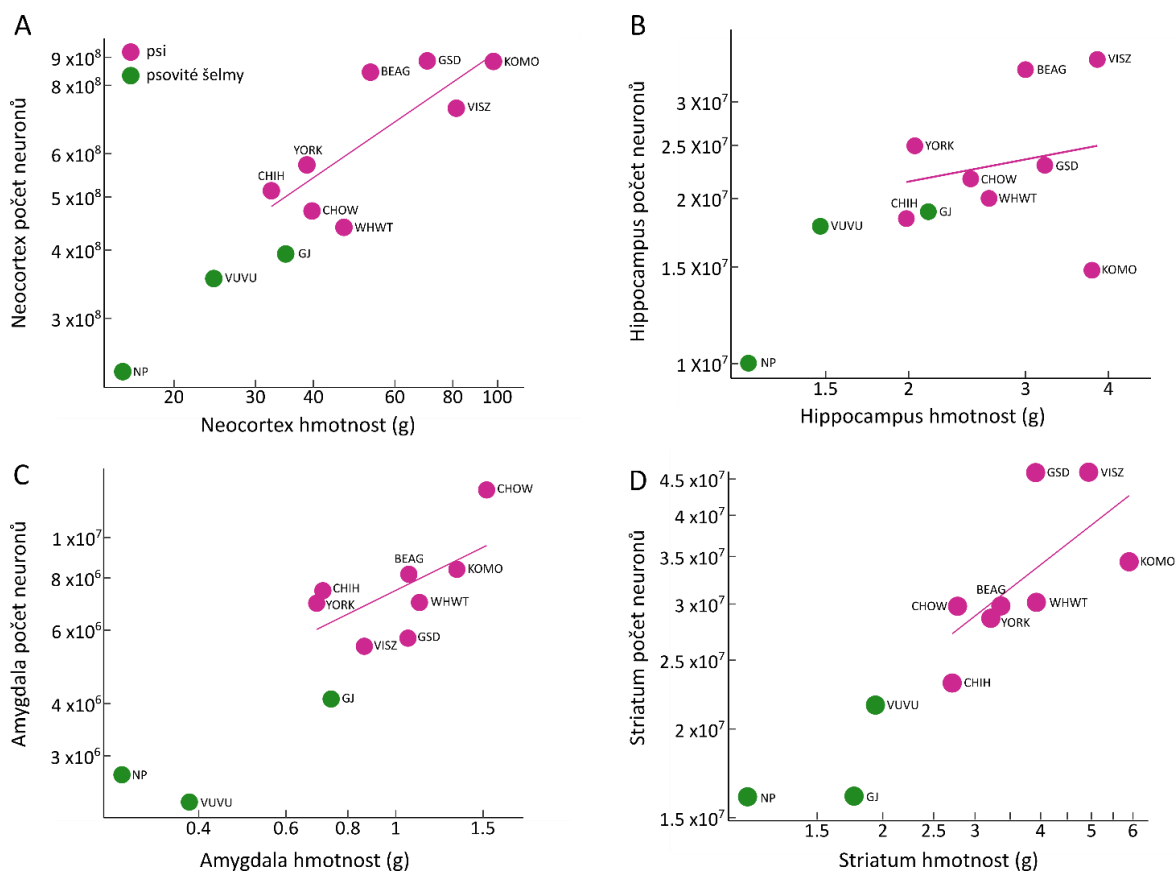
Obrázek č. 13. Procentuální distribuce neuronů (A), nonneuronálních buněk (B) a hmotností (C) vynesené v závislosti na velikosti mozku.

3.4. Relativní velikost struktur mozku

Pravidla buněčného škálování jsou specifická pro různé části mozku savců (Herculano-Houzel, 2011). Největší procentuální podíl na celkové váze mozku má jednoznačně koncový mozek (obrázek č. 13 E), který tvoří průměrně 74 % hmotnosti mozku, největší hmotnostní podíl této struktury jsem pozorovala u čivavy (76 %), nejmenší u plemene čau čau (70 %). Struktura zabírající nejnižší procento celého mozku je čichový lalok, který průměrně dosahuje hmotnosti 2 % z celkové hmotnosti mozku, ale vzhledem k tomu, že byl u některých psů čichový lalok poškozen, nebyl zahrnut do analýzy.

3.5. Poměr neuronů a nonneuronálních buněk

Procentuální zastoupení nonneuronálních buněk se pohybuje od 71,6 % do 80,4 %, poměr mezi nonneuronálními a neuronálními buňkami v celém mozku je někde mezi 2,5:1 a 4,1:1. Nonneuronální jsou v mozku rozptýleny relativně rovnoměrně, avšak hustoty neuronů se mezi strukturami výrazně liší, výsledkem je značně nerovnoměrné zastoupení nonneurálních buněk. Nejnižší poměr jsem pozorovala v mozečku – nonneurální buňky zde tvoří 22,5 – 33,6 %. Ve všech ostatních analyzovaných částech mozku převládají nonneuronální buňky nad neurony. V koncovém mozku tvoří 84,3 – 88,8 % všech buněk, v mezimozku 89,9 – 94,8 % všech buněk, ve středním mozku 87,3 – 93,5 % všech buněk a v prodloužené míše 92,3 – 92,9 % všech buněk. Divoké psovitě šelmy se od psů v tomto ohledu výrazněji neliší. Takže převaha nonneuronálních buněk v mozku u psovitých šelem se dá vysvětlit relativně nízkými hustotami neuronů ve všech strukturách mozku s výjimkou mozečku.



Obrázek č. 14. Vztah mezi počtem neuronů a hmotnostmi u vybraných částí koncového mozku: (A) Neokortex, (B) hippocampus, (C) amygdala, (D) striatum.

Zkratky pro jednotlivá zvířata: BEAG, bígl; CHIC, čivava; CHOW, čau čau; GJ, šakal obecný; GSD, německý ovčák; KOMO, komondor; NP, psík mývalovitý; VISZ, maďarský ohař – vizsla; VUVU, liška obecná; WHWT, west highland white teriér; YORK, jorkširský teriér.

3.6. Struktury koncového mozku

Koncový mozek je výrazně zvětšená struktura mozku, která je značně gyrifikovaná a tvoří u psů přibližně 75 % celkové hmoty mozku. Je zajímavé, že tento poměr se liší u studovaných psů a divokých kanidů jen nepatrně, nehledě na výrazné rozdíly ve velikosti těla dané mimo jiné miniaturizací některých psích plemen (obrázek č.14). Nejvíce neuronů z celého koncového mozku je obsaženo v neokortexu a to od 440 milionů u west highland white teriéra po 883 milionů u německého ovčáka. Z výše uvedeného množství neuronů je 9–21 % neuronů lokalizováno v prefrontální kůře, konkrétně se absolutní počty prefrontálních neuronů pohybovaly od 75,3 milionů neuronů u čivavy až k 152 milionům neuronů u bígla. Rovněž piriformní kůra obsahuje překvapivě vysoké počty neuronů od 57,9 milionů neuronů u psa plemene čau čau po 130,7 milionů u jorkširského teriéra. Ve striatu je obsaženo neuronů už

podstatně méně a to od 23,2 milionů u čivavy po 46,1 milionů u maďarského ohaře. V hippocampu se pak neurony pohybují v rozmezí od 14,8 milionů neuronů u komondora po 35,8 milionů u maďarského ohaře. Pro amygdalu se pohybují počty neuronů od 5,5 milionů u maďarského ohaře po 13 milionů u plemena čau čau. Entorhinální kortex obsahuje nejméně 3,3 milionů neuronů u west highland white teriéra a nejvíce 6,2 milionů neuronů u komondora. Strukturou koncového mozku s nejmenším počtem neuronů je septum, obsahuje totiž jen od 1,6 milionů neuronů u jorkširského teriéra po 3,6 milionů neuronů u maďarského ohaře.

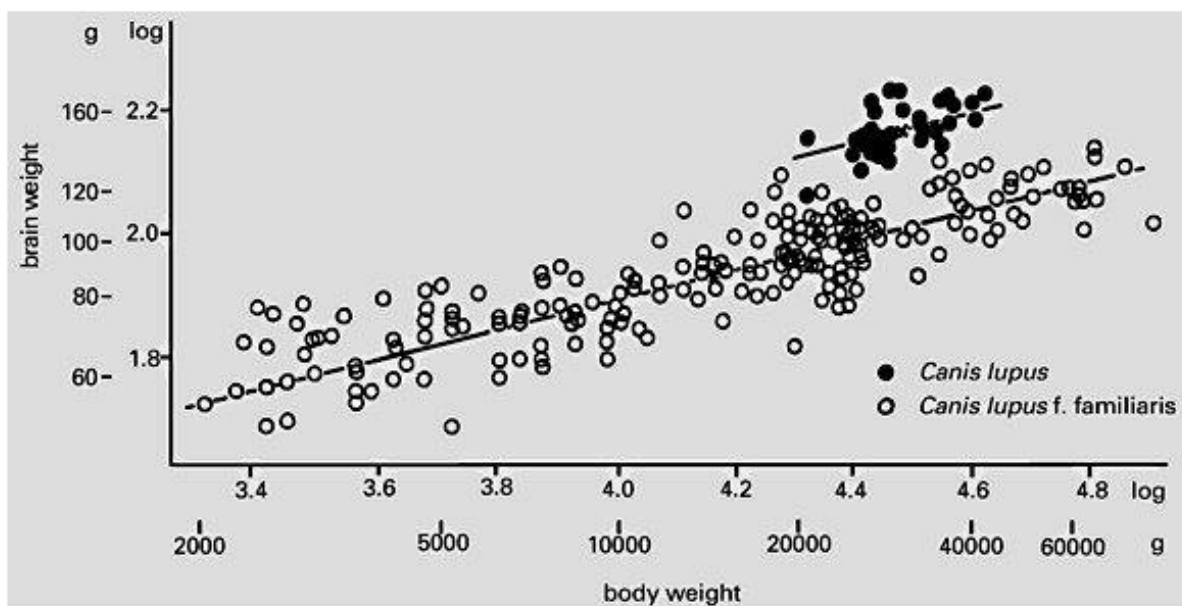
4. DISKUZE

4.1. Technické a datové limity studie

Dataset této studie je limitován tím, že psi nebyli usmrceni za účelem této studie. Byli věnováni pro účely vědy až posmrtně a se souhlasem majitelů, a to především kvůli studii Enikő Kubinyi o stárnutí u psů. Dále pak část jedinců byla vyloučena ze studie kvůli nevyhovujícímu věku nebo poškození mozku a některým onemocněním. Rovněž se nepodařilo získat mozek vlka, který by nejlépe vrhl světlo na skutečný rozdíl mezi domestikovaným psem a jeho divokým předkem. Srovnání s vlkem je zde proto jen volumetrické, založené na datech z dostupné literatury, která zatím neobsahuje počty neuronů. Dále pak by bylo vhodné tento dataset rozšířit o další divoké psovitě šelmy, aby bylo možné porovnat škálovací pravidla pro divoké kanidy s tímtež pro plemena psů.

4.2. Absolutní a relativní velikost mozku

Při porovnání velikosti mozku a hmotnosti těla je zřejmé, že malá psí plemena mají překvapivě velký mozek oproti stejně velkým divokým psovitým šelmám. Dále pak i absolutní počet neuronů je u malých plemen psa domácího nápadně vyšší než u divokých psovitých šelem stejného věku. Toto může být způsobeno tím, že psi jsou selektováni na velikost těla a mozek se zmenšuje až sekundárně, tedy pozvolněji. Při porovnání velikosti mozku vůči tělu je zajímavé, že mozky menších plemen psů jsou překvapivě velké. Při porovnání psa domácího s vlkem různých velikostí, má vlk vždy větší mozek než stejně velký pes (obrázek č. 15). Hmotnost těl různých psích jedinců se na základě jejich variability pohybuje v rozmezí od 2 až 100 kilogramů. Ve srovnání s tím jsou tělesné hmotnostní rozdíly u vlka z různých populací poměrně malé. Hmotnost vlka se pohybuje mezi 36 kg (Moehlman et al., 1997) a 48 kg (Klatt nach Weidemann, 1970). Divoké psovitě šelmy mohou vážit od 1,3 kg (fenek) až do 48 kg u vlka. Díky vysoké variabilitě v tělesné velikosti je pes ideálním modelem ke zkoumání vnitrodruhových alometrických vztahů (Wayne, 1986; Chase et al., 2005). Tato studie potvrzuje známý fakt, že vnitrodruhová alometrie je u savců výrazně plošší než mezidruhová (viz např. Tsuboi et al., 2018). Při porovnání dvou vnitrodruhových alometrií je sklon (směrnice) regresních přímek stejný (obrázek č. 15).

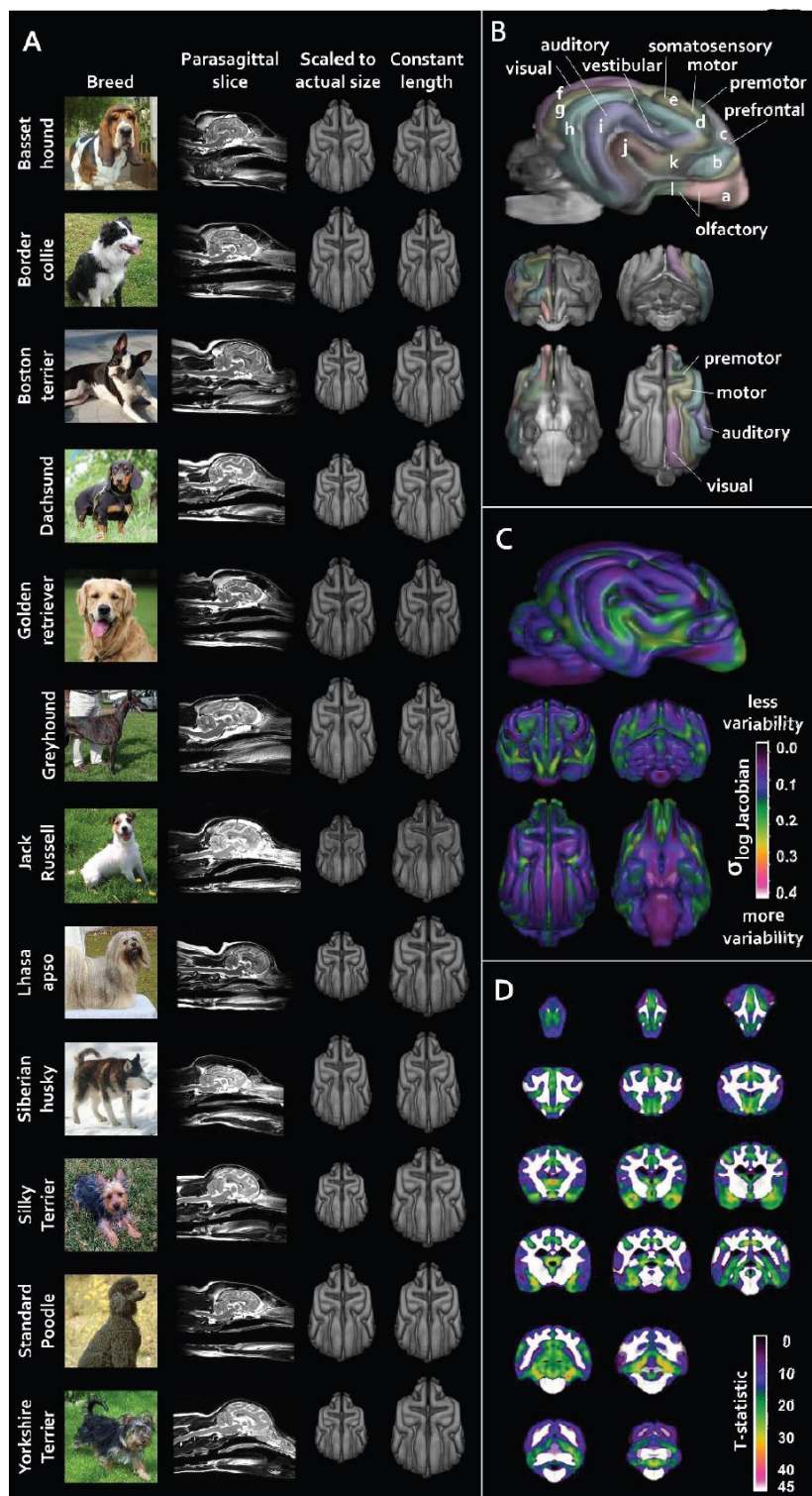


Obrázek č. 15. Srovnání velikosti mozku psa a vlka. *Canis lupus*, vlk obecný, *Canis lupus f. familiaris*, pes domácí. Převzato z Kruska (1988).

Podle velké velikosti mozku u vlka by se mohlo zdát, že velikost mozku hraje klíčovou roli pro přežití a reprodukci divokých zvířat. Proto je překvapivé, že domestikovaní psi, kteří zdivočeli, nevykazují nárůst velikosti mozku, a to navzdory mnoha generacím žijícím v divokém prostředí (Kruska, 2005). Rohrs a Ebinger (1999) srovnávali velikost mozku u zdivočelých a domestikovaných forem psa domácího a nenalezli žádný důkaz o jeho opětovném zvětšení k původní velikosti. Při opětovné feralizaci jedince tedy není účinek domestikace obrácen (Kruska, 1987). Může to být způsobeno například tím, že feralizace neproběhla před dostatečně dlouhou dobou pro opětovné zvětšení mozku, anebo následkem toho, že prostředí, ve kterém psi opět zdivočeli, není stejné, jako bylo prostředí, ve kterém žili jejich divocí předci s velkými mozky (Price, 2002).

Rozdíly v relativní velikosti mozku u psovitých šelem lze vysvětlit ekologickými podmínkami, ale byl také popsán silný vztah mezi absolutní velikostí mozku a kognitivními schopnostmi u různých plemen psů (Horschler et al., 2019). Je to potvrzeno i objevy výrazných rozdílů ve velikosti mozku nejen v řádu šelem, ale i v jiných řádech, kde došlo vlivem domestikace ke změně ve velikosti jednotlivých částí mozku. Například u amerických norků (*Mustela vison*) bylo u domestikantů popsáno zmenšení všech částí mozku nezávisle na velikosti těla, věku a pohlaví, oproti divokým norkům téhož druhu (Kruska, 1996). Další

srovnávací analýzy byly provedeny u hlodavců, hmyzožravců a zajícovců (Mace et al., 1981), kde je relativní velikost mozku závislá na různých faktorech; jako například čeled', kde veverkovití (*Sciuridae*) mají největší relativní velikosti mozku, zatímco rypošoviti (*Bathyergidae*) mají nejmenší relativní velikosti mozku; anebo habitat, kde lesní druhy mají větší relativní velikosti mozku než druhy luční; typ potravy, kde folivoři mají menší relativní velikosti mozku než potravní generalisti, insektivori, frugivoři a granivoři; podle typu prostředí, kde arboreální druhy mají větší relativní velikosti mozku než druhy terestrické; podle aktivity, kde druhy noční mají relativně větší mozky než diurnální druhy (Mace et al., 1981). U letounů je relativní velikost mozku také ovlivněná potravní strategií (Eisenberg, 1978). Dále u vačnatců má vliv na relativní velikost mozku životní prostředí (Eisenberg, 1981). U primátů jsou opět rozdíly v relativní velikosti mozku mezi taxony, kdy denní lemuroviti (*Lemuridae*) mají nejmenší relativní velikosti mozku, zatímco gorily, orangutani a šimpanzi (*Pongidae*) mají relativně největší mozky, ale vliv na relativní velikost mozku má stále typ potravy, kdy folivoři mají relativně menší mozky než frugivoři (Harvey & Clutton-Brock, 1980). Je tedy představitelné, že přechod od masožravosti ke všežravosti byl jednou z příčin zmenšení mozku u domestikovaných psů (*Canis lupus f. familiaris*) oproti vlkům obecným (*Canis lupus*).



Obrázek č. 16. Srovnání stavby mozku u psích plemen. Převzato z Hecht et al. 2019. (A) Rozdíly ve stavbě a velikosti mozku mezi studovanými plemeny. (B) Rozložení jednotlivých analyzovaných funkčních oblastí kůry mozkové. (C) Mapa znázorňující míru variance ve velikosti pro jednotlivé oblasti kůry mozkové. (D) Barevně znázorněné rozdíly ve variabilitě jednotlivých studovaných oblastí šedé hmoty.

Navíc se struktury mozku mezi jednotlivými plemeny liší relativní velikostí, ta však do jisté míry škáluje i s absolutní velikostí mozku daného plemene (Obr. 16). Nejnovější studie (Hecht et al., 2019) odhalují, které struktury se nejčastěji odlišují. Například objem neokortexu se zvětšuje s objemem mozku hyperalometricky. Zatímco mozeček a několik dalších mozkových struktur se zvětšuje s mozkem hypoalometricky (Barton, 2012). Tyto výsledky byly získány za pomoci MRI (Hecht et al., 2019). Výsledky získané v této studii disekcí mozků jsou s výše uvedenou studií ve shodě. Pozorovala jsem rovněž objemové rozdíly u jednotlivých plemen (Tab. 2 a 6; Obr. č. 8, 11, 13E, F), avšak vzhledem k omezené velikosti vzorku nebylo možno zohlednit individuální variabilitu a má data jsou v tomto ohledu spíše předběžná.

4.3. Počty neuronů v celých mozcích

Hmotnost mozku psů škáluje s počtem neuronů obdobně jako u šelem. Malá psí plemena mají relativně větší mozky a tím pádem i více neuronů než stejně velké divoké psovitě šelmy. Jedna z teorií vysvětluje tento fakt tím, že velké šelmy mají už dost neuronů a víc jich nepotřebují. Dále pak je ve větších mozcích větších zvířat patrné zmenšení hustoty neuronů (Herculano-Houzel, 2011), což je to dáno těmito 2 faktory: nárůstem velikosti neuronů a nárůstem relativního počtu gliových buněk. Počet neuronů u zkoumaných zvířat tedy není přímo závislý na velikosti těla. Čivava má větší mozek než celkově větší liška, ale počet neuronů je, i když ne o mnoho, vyšší u lišky. Je třeba sesbírat více dat, aby byl tento výsledek potvrzen. Šakal obecný má výrazně méně neuronů než podobně velká plemena, například west highland white teriér. Rozdíl v tělesné hmotnosti činí pouhých 200 g, teriér má však o celou pětinu více neuronů. A zvláště výrazný je psík mývalovitý, který má na hmotnost svého těla relativně nejmenší mozek ze všech zkoumaných zvířat, a to tak, že oproti obdobně velkým zvířatům jen třetinový. Nutno dodat že hustotou neuronů patří do průměru. Celkový počet neuronů je proto výrazně menší než u obdobně velkých psů.

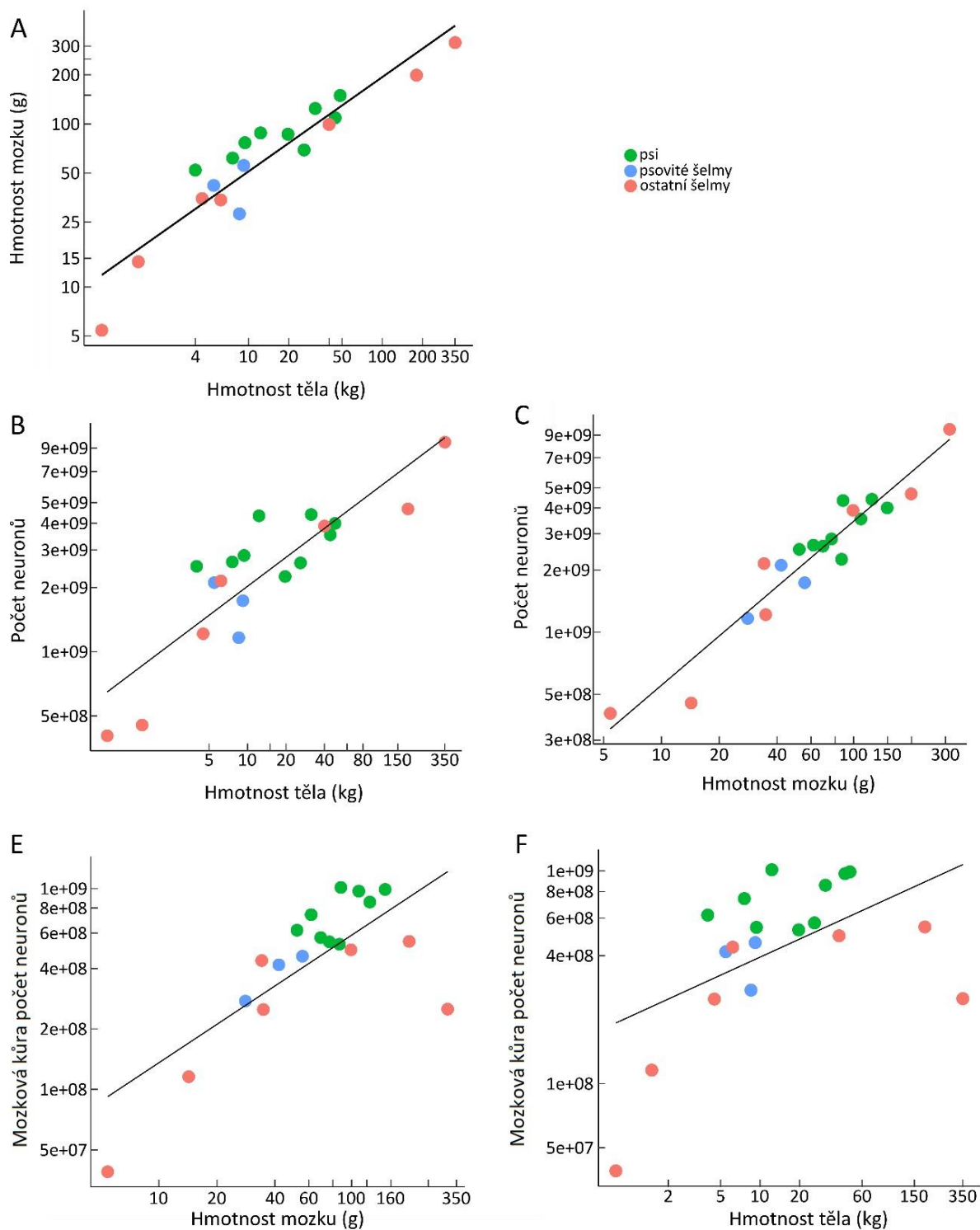
4.4. Počty neuronů v hlavních částech mozku

Celkový počet neuronů obsažený v dané struktuře je dán její absolutní velikostí a hustotou neuronů. Jak již bylo zmíněno výše, velikost jednotlivých struktur mozku různě škáluje s celkovou velikostí mozku, a rovněž hustoty neuronů se v jednotlivých strukturách mozku výrazně liší (Herculano-Houzel et al., 2015). Například v mozečku je 15krát větší hustota

neuronů než v prodloužené míše. Mé výsledky překvapivě ukazují, že počet neuronů v prodloužené míše nekoreluje s tělesnou velikostí studovaných psích plemen. Je tedy možné, že počet neuronů potřebných k základním reakcím a reflexům je přibližně stejný, nehledě na velké rozdíly v tělesné velikosti. Psi mají, stejně jako ostatní savci, nejvíce neuronů v mozečku. Ten obsahuje v průměru 71 % neuronů jak u domestikovaného psa, tak i u dalších zkoumaných psových šelem. Zatímco koncový mozek, největší struktura psího mozku, obsahuje v průměru 24 % všech neuronů. Zastoupení neuronů v ostatních strukturách je oproti těmto dvěma výrazně nižší. Tyto poměry jsou obdobné jak pro psy, tak pro divoké psovité šelmy.

Psovité šelmy jsou zvířata čichově se orientující. Čich používají při stopování kořisti, při sociálních komunikacích i reprodukčním chování, a proto byl předpokládán vyšší počet neuronů v piriformní kůře a čichovém laloku, které jsou úzce funkčně spjaty s čichem. Počty neuronů se však v těchto oblastech mezi psy a divokými psovými šelmami nelišily.

Další zajímavostí objevující se v této studii je malý mozek u plemene čaučau. Čaučau je psem, který byl už ve východní Asii primárně šlechtěn ne jako společník člověka, ale jako pes pro manuální práci, zejména pro psí spřežení, ochranu dobytka či lov, v neposlední řadě ale i jako zdroj masa. Jeho mozek je pouze o 8 gramů těžší než u téměř 4krát menšího yorkšírského teriéra. I v porovnání s jinými psovými šelmami je relativní velikost mozku u čaučaua nápadně nízká. Čaučau se ale považuje za jedno z bazálních plemen psů, které předchází vzniku moderních plemen psů v 19. století (Larson et al., 2012). Zdá se tedy, že vliv na velikost mozku by mohlo mít i období (a s ním spojený účel šlechtění), kdy ke vzniku plemene došlo. Samozřejmě, dokud nejsou k dispozici data od více jedinců, nemohou být tyto výsledky použity jako obecná tvrzení. Nicméně tento konkrétní pes byl outlier i ve velikosti amygdaly, která je mnohem větší než u ostatních zkoumaných psových šelem. Amygdala hraje klíčovou úlohu v řadě emocionálních funkcí, včetně vnímání strachu a negativních podnětů. Další výzkum v této oblasti by mohl vrhnout světlo na spojení mezi velikostí mozku a amygdaly a šlechtěním zvířete pro masnou výrobu. Možnost, že by šlechtění plemene na určitou vlastnost mohlo pozměnit i stavbu mozku, zkoumali i Gazit & Terkel (2003). Potvrdili, že pracující psi jsou více zaměřeni na schopnost čichovou než na vizuální. Vzhledem k limitovanému datasetu, který neumožňuje srovnání individuální variability s variabilitou mezi plemeny, je mou prací v tomto ohledu zatím nutno považovat za předběžnou.



Obrázek č. 17. Srovnání buněčného škálování mezi psy, psovitými a ostatními šelmami. Data z této studie jsou porovnané s daty o ostatních šelmách převzatých z Jardim-Messeder (2017); (A) Vztah mezi hmotnostmi těla a hmotnostmi mozku; (B) Vztah mezi hmotnostmi těla a absolutním počtem neuronů; (C) Vztah mezi hmotnostmi mozku a absolutním počtem neuronů; (D) Vztah mezi hmotnostmi mozku a počtem neuronů v mozkové kůře; (E) Vztah mezi hmotnostmi mozku a počtem neuronů v mozkové kůře; (F) Vztah mezi hmotnostmi těla a počtem neuronů v mozkové kůře.

Mé výsledky je možno srovnat s recentně publikovanými daty týkajícími se dalších šelem (Jardim-Messeder et al., 2017). Takovéto srovnání (Obr. č. 17) demonstruje, že domestikovaní psi mají průměrné hustoty neuronů obdobné jako divoké šelmy. Výjimku tvoří mozková kůra, ve které je hustota neuronů u domestikovaných psů výrazně vyšší než u ostatních šelem.

4.5. Distribuce neuronů v koncovém mozku

Vzhledem k velké velikosti psích mozků bylo nezbytné mozky rozdělit na menší části kvůli zpracování, při tom byl brán zřetel na jednotlivé funkční oddíly obsažené v především největší části mozku, v mozku koncovém. Ten byl tedy rozdělen na následující části: neokortex (zahrnující prefrontální kůru oddělenou zvlášť), piriformní kůra, striatum, septum, diencephalon (zahrnující *area preoptica*), amygdala, hippocampus a entorhinální kůra. Jednotlivé části byly porovnány jak mezi plemeny, tak i s divokými psovíty šelmami. Například amygdala, striatum a piriformní kůra jsou u všech zkoumaných divokých psovíty šelem signifikantně menší než u plemen psa, což je možný vedlejší důsledek domestikace. Koncový mozek u psovíty šelem je vysoce gyrifikovaný. Je to také struktura, která zabezpečuje obrovské množství funkcí, a u které se očekává přímá souvislost s vývojem sociálního chování (Burish, 2004). Jeho zastoupení v celkové hmotnosti mozku u námi zkoumaných psovíty šelem je až 75,68 %, tato hodnota má variabilitu jen do 7 %, a navíc neškáluje s hmotností mozku jako je tomu u jiných savců a ptáků (Sarko, 2009; Gabi et al., 2010, Olkowicz et al., 2016). Možná je to způsobeno tím, že psi jsou stále jeden druh, a tak nejsou některé vnitřní rozdíly mezi nimi výrazné. Poměr neuronů vůči gliovým buňkám je v průměru jen 15,6 %. U zpracovaných psovíty šelem je maximální zastoupení neuronů v koncovém mozku 14,5 %.

Výsledky této studie tak potvrzují tvrzení obsažené v článku Suzany Herculano-Houzel et al., (2011) a to tak, že stejně jako jiní savci (s výjimkou primátů) má pes se vzrůstající hmotností současně nižší hustotu neuronů.

4.6. Nonneuronální buňky

Podle dosavadních studií (Olkowicz et al., 2016, Azevedo et al., 2009, Gabi et al., 2010, Herculano-Houzel et al., 2007a, Herculano-Houzel et al., 2007b, Herculano-Houzel et al., 2011, Herculano-Houzel et al., 2015, Dos Santos., 2017, Kazu et al., 2014) je možné se domnívat, že

hustota nonneuronálních buněk je velmi konzervativní. A proto se napříč druhy a strukturami škáluje počet nonneurálních buněk s velikostí struktury velmi srovnatelně. Avšak, protože se hustoty neuronů výrazně liší jak v různých částech mozku i mezi taxony, poměry nonneuronálních buněk vůči neuronům se u jednotlivých studovaných struktur výrazně liší. Nejnížší procento nonneurálních buněk bylo pozorováno v mozečku (22–34 % nonneuronálních buněk ku 64–78 % neuronů), kdežto nejvyšší v mezimozku (89,9 – 94,8 % nonneuronálních buněk ku 10,1–5,2 % neuronů). Obdobné poměry neuronů a nonneuronálních buněk byly pozorovány rovněž u hlodavců, hmyzožravců, afrotherií, sudokopytníků i primátů (Suzana Herculano-Houzel et al., 2011; Azevedo et al., 2009; Sarko, 2009; Gabi et al., 2010). Jediným výraznou odchylkou je nižší hustota nonneuronálních buněk v koncovém mozku u ptáků (Olkowicz et al., 2016). Podle výsledků této studie na psech je hustota nonneuronálních buněk u psů stabilní, což souhlasí s výše uvedenými studiemi.

4.7. Srovnání s dalšími savci

Velikost mozku savců se liší v závislosti na druhu přibližně 100 000krát (Tower, 1954; Stolzenburg et al., 1989). Suzana Herculano Houzel objevila, že počet neuronů u primátů škáluje izometricky s velikostí mozku (tj. průměrná hustota neuronů neklesá s velikostí mozku), zatímco u všech ostatních savců počet neuronů škáluje hypoalometricky s velikostí mozku (tj. hustota neuronů s velikostí mozku klesá) (review viz Herculano-Houzel, 2015).

Jedinou skupinou, která se liší od ostatních neprimátích skupin, jsou hmyzožravci. Jejich velikost mozku sice narůstá pomaleji vůči hmotnosti těla jako u všech ostatních neprimátích savců, s výjimkou mozečku a čichových laloků. V těchto částech velikost mozečku a čichových laloků narůstá izometricky, obdobně jako v primátím mozku. Namnožení neuronů v čichových strukturách bez výrazného zvětšení velikosti struktury zřejmě souvisí s hmyzožravčím způsobem života, tj. obstarávání potravy závislé na čichu. Ostatní prozkoumané savčí druhy neprimátů jako jsou vačnatci (Kazu et al., 2014) nebo hlodavci (Herculano-Houzel et al., 2007b; 2011) spolu sdílejí pravidla pro škálování neuronů v mozkové kůře.

Pro bližší porozumění rozdílům v mozku mezi psovitými šelmami a hlodavci. Můžeme spolu porovnat podobně velká zvířata z obou skupin, a to kapybaru s hmotností 47,5 kg s přibližně stejně těžkým komondorem 48,4 kg. Mozek kapybary váží 76 g a obsahuje 1 601 milionů neuronů (Herculano-Houzel et al., 2006), mozek komondora váží 149 g a

obsahuje 3 990 milionů neuronů. Z toho vyplývá, že psi mají dvakrát větší mozek než stejně velcí hlodavci, a i hustota neuronů v psích mozcích je vyšší.

Při porovnávání s mozky primátů jsou psovitě šelmy zcela jasně odlišné tím, že jim rychleji narůstá velikost (hmotnost) mozku než počet neuronů. Na rozdíl od všech ostatních savců roste počet buněk u primátů lineárně s velikostí mozku (Herculano-Houzel et al., 2007a). Hustota neuronů v mozcích primátů proto nekoreluje s velikostí mozku a je nápadně vyšší než u jiných savčích skupin. Konkrétně lze porovnat primáta rodu makak s čivavou. Makak má hmotnost těla 3,9 kg; hmotnost mozku 87 g a celý jeho mozek obsahuje 6 376 milionů neuronů. Čivava váží 4 kg; v mozku o hmotnosti 52 g má pouze 2 510 milionů neuronů. Z těchto dat je zřejmé, že ačkoli má čivava stejnou hmotnost těla, její mozek je výrazně menší a také obsahuje téměř třikrát méně neuronů než mozek makaka (Herculano-Houzel et al., 2007a).

Tato studie je prvním krokem ke zjištění, zda domestikální změny skutečně vedou ke snížení výpočetní kapacity mozku. Přidání vlka do datasetu jistě prozradí mnohem více, ale už teď je zřejmé, že pes má více neuronů a větší mozek než stejně velké divoké psovitě šelmy, a že při zmenšování velikosti těla psa se mozek a počet neuronů zmenšuje pomaleji. Navíc je patrné, že se počty neuronů liší v jednotlivých částech mozku, a to v závislosti na plemeni a jeho šlechtitelské minulosti. Je proto možné předpokládat, že dřívější závěry označující domestikanty za zvířata se sníženou inteligencí jsou mylné. Samozřejmě je třeba provést další zkoumání a podívat se domestikaci mozků i z jiného úhlu, aby bylo možné z dat získaných v této diplomové práci vyvodit obecně platné závěry. Nicméně již tato předběžná data silně naznačují, že domestikace nemusí být z hlediska komplexity a výpočetní kapacity mozku tak regresivní, jak se běžně soudí.

5. ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce přinesly první obsáhlejší data o buněčném složení mozku domestikovaného psa. S využitím metody izotropní frakční homogenizace bylo analyzováno buněčné složení mozku u 8 plemen psa domácího a 3 druhů divokých psovitých šelem. Ze získaných kvantitativních dat byla následně odvozena pravidla buněčného škálování. Tato pravidla spolu s absolutními počty, hustotami a poměry neuronů a gliových buněk, absolutními a relativními velikostmi mozku byla následně porovnána mezi sebou, a i s dalšími šelmami, jejichž hodnoty byly získány z literatury. Vztah mezi hmotností těla a velikostí mozku byl dále porovnán na nevelkém vzorku dat získaných z literatury.

Hlavní výsledky této práce lze shrnout takto:

- 1) Plemena psa domácího jsou méně encefalizovaná než vlk obecný, ale menší plemena vykazují vyšší míru encefalizace než stejně velké psovité šelmy.
- 2) Hmotnost mozku u psa domácího roste, stejně jako u ostatních živočichů, negativně alometricky s rostoucí hmotností těla. Škálovací koeficient (směrnice regresní přímky) je výrazně nižší než 1,0 (0,345).
- 3) Vztah mezi počtem neuronů a velikostí mozku lze popsat mocninou funkcí $NBR = 2716 \times 10^5 MBR^{0,558}$. Vzhledem k tomu, že škálovací koeficient je výrazně nižší než 1, jakékoli navýšení počtu neuronů je doprovázeno ještě výraznějším nárůstem velikosti mozku.
- 4) Hustota neuronů u psů klesá s velikostí mozku.
- 5) Divoké psovité šelmy zařazené do této studie mají výrazně méně neuronů než stejně velcí psi.
- 6) Největší částí mozku je koncový mozek, tvoří 70–76 % hmotnosti psiho mozku, obsahuje však pouze 19–28 % mozkových neuronů.
- 7) Naopak mozeček, tvořící pouze 9–12 % hmotnosti psiho mozku, obsahuje 66–76 % mozkových neuronů.
- 7) Poměr neuronů a gliových buněk je silně posunut ve prospěch buněk gliových, které tvoří v průměru 72–80 % v celém mozku. Jedinou strukturou, kde dominují početně neurony, je mozeček (nonneurální buňky tvoří pouze 23–34 % mozečkových buněk).
- 8) Hustoty gliových buněk jsou ve všech strukturách víceméně stejné, naopak hustoty neuronů se výrazně liší mezi studovanými částmi mozku.
- 9) Mozky psů obsahují menší množství neuronů než stejně velké mozky primátů, ale větší počet neuronů než stejně velké mozky hlodavců.

6. REFERENCE

- Aiello, L. C., & Wheeler, P. (1995). The expensive-tissue hypothesis: the brain and the digestive system in human and primate evolution. *Current anthropology*, 36(2), 199-221.
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: glia—more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675.
- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., ... & 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), 532-541.
- Bahney, J., & von Bartheld, C. S. (2014). Validation of the isotropic fractionator: comparison with unbiased stereology and DNA extraction for quantification of glial cells. *Journal of neuroscience methods*, 222, 165-174.
- Barrett, L., Dunbar, R. I. M., & Lycett, J. (2007). *Evoluční psychologie člověka*. Portál.
- Barton, R. A., & Harvey, P. H. (2000). Mosaic evolution of brain structure in mammals. *Nature*, 405(6790), 1055.
- Barton, R. A. (2012). Embodied cognitive evolution and the cerebellum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1599), 2097-2107.
- Boyko, A. R., Quignon, P., Li, L., Schoenebeck, J. J., Degenhardt, J. D., Lohmueller, K. E., ... & Auton, A. (2010). A simple genetic architecture underlies morphological variation in dogs. *PLoS biology*, 8(8), e1000451.
- Burish, M. J., Kueh, H. Y., & Wang, S. S. H. (2004). Brain architecture and social complexity in modern and ancient birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 63(2), 107-124.
- Chittka, L., & Niven, J. (2009). Are bigger brains better?. *Current biology*, 19(21), R995-R1008.
- Clutton-Brock, T. H., & Harvey, P. H. (1980). Primates, brains and ecology. *Journal of zoology*, 190(3), 309-323.
- Cohen, J. A., & Fox, M. W. (1976). Vocalizations in wild canids and possible effects of domestication. *Behavioural Processes*.

- Coppinger, R., & Schneider, R. (1995). Evolution of working dogs. *The domestic dog: Its evolution, behaviour and interactions with people*, 21-47.
- Coppinger, R., & Coppinger, L. (2001). *Dogs: A startling new understanding of canine origin, behavior & evolution*. Simon and Schuster.
- Darwin, C. R. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle of Life (Muray, London).
- Darwin, C. R. (1868). Variation of plants and animals under domestication.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898), 700.
- Dos Santos, S. E., Porfirio, J., da Cunha, F. B., Manger, P. R., Tavares, W., Pessoa, L., ... & Herculano-Houzel, S. (2017). Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as “Primitive” as Expected. *Brain, behavior and evolution*, 89(1), 48-63.
- Drake, A. G., & Klingenberg, C. P. (2010). Large-scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *The American Naturalist*, 175(3), 289-301.
- Drake, A. G., Coquerelle, M., & Colombeu, G. (2015). 3D morphometric analysis of fossil canid skulls contradicts the suggested domestication of dogs during the late Paleolithic. *Scientific reports*, 5, 8299.
- Driscoll, C. A., Macdonald, D. W., & O'Brien, S. J. (2009). From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 1), 9971-9978.
- Dunbar, R. I. (1998). The social brain hypothesis. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews*, 6(5), 178-190.
- Dunbar, R. I., & Shultz, S. (2007). Evolution in the social brain. *science*, 317(5843), 1344-1347.
- Ebinger, P. (1974). A cytoarchitectonic volumetric comparison of brains in wild and domestic sheep. *Zeitschrift fuer Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 144(3), 267-302.
- Eisenberg, J. F., & Wilson, D. E. (1978). Relative brain size and feeding strategies in the Chiroptera. *Evolution*, 740-751.

- Eisenberg, J. F., & Wilson, D. E. (1981). Relative brain size and demographic strategies in didelphid marsupials. *The American Naturalist*, 118(1), 1-15.
- Evans, H. E. (1993). Prenatal development. *Miller's Anatomy of the Dog*. 3rd edition. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 32-97.
- Frynta, D., Baudyšová, J., Hradcová, P., Faltusová, K., & Kratochvíl, L. (2012). Allometry of sexual size dimorphism in domestic dog. *PLoS One*, 7(9), e46125.
- Gabi, M., Collins, C. E., Wong, P., Torres, L. B., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2010). Cellular scaling rules for the brains of an extended number of primate species. *Brain, behavior and evolution*, 76(1), 32-44.
- Gazit, I., & Terkel, J. (2003). Explosives detection by sniffer dogs following strenuous physical activity. *Applied Animal Behaviour Science*, 81(2), 149-161.
- Germonpré, M., Sablin, M. V., Stevens, R. E., Hedges, R. E., Hofreiter, M., Stiller, M., & Després, V. R. (2009). Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science*, 36(2), 473-490.
- Germonpré, M., Lázničková-Galetová, M., & Sablin, M. V. (2012). Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Předmostí site, the Czech Republic. *Journal of Archaeological Science*, 39(1), 184-202.
- Haug, H. (1987). Brain sizes, surfaces, and neuronal sizes of the cortex cerebri: a stereological investigation of man and his variability and a comparison with some mammals (primates, whales, marsupials, insectivores, and one elephant). *American Journal of Anatomy*, 180(2), 126-142.
- Herre, W. (1980). Grundfragen zoologischer Domestikationsforschung. *Nova acta Leopoldina/Abh. der Deutschen Akad. der Naturforscher Leopoldina*. NF.
- Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., & Kaas, J. H. (2007a). Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3562-3567.
- Herculano-Houzel, S. (2007b). Encephalization, neuronal excess, and neuronal index in rodents. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(10), 1280-1287.

Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Da Silva, A. V., Torres, L. B., Catania, K. C., & Kaas, J. H. (2011). Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs). *Brain, behavior and evolution*, 78(4), 302-314.

Herculano-Houzel, S. (2011). 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), 191-199.

Herculano-Houzel, S., Catania, K., Manger, P. R., & Kaas, J. H. (2015). Mammalian brains are made of these: a dataset of the numbers and densities of neuronal and nonneuronal cells in the brain of glires, primates, scandentia, eulipotyphlans, afrotherians and artiodactyls, and their relationship with body mass. *Brain, Behavior and Evolution*, 86(3-4), 145-163.

Horschler, D. J., Hare, B., Call, J., Kaminski, J., Miklósi, Á., & MacLean, E. L. (2019). Absolute brain size predicts dog breed differences in executive function. *Animal cognition*, 22(2), 187-198.

Chase, K., Carrier, D. R., Adler, F. R., Jarvik, T., Ostrander, E. A., Lorentzen, T. D., & Lark, K. G. (2002). Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: principal component analysis of the canid skeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9930-9935.

Chase, K., Carrier, D. R., Adler, F. R., Ostrander, E. A., & Lark, K. G. (2005). Interaction between the X chromosome and an autosome regulates size sexual dimorphism in Portuguese Water Dogs. *Genome research*, 15(12), 1820-1824.

Isler, K., & Van Schaik, C. P. (2006). Metabolic costs of brain size evolution. *Biology Letters*, 2(4), 557-560.

Jardim-Messeder, D., Lambert, K., Noctor, S., Pestana, F. M., de Castro Leal, M. E., Bertelsen, M. F., ... & Herculano-Houzel, S. (2017). Dogs have the most neurons, though not the largest brain: trade-off between body mass and number of neurons in the cerebral cortex of large carnivoran species. *Frontiers in neuroanatomy*, 11, 118.

Jerison, H. J. (1975). Evolution of the brain and intelligence. *Current Anthropology*, 16(3), 403-426.

Jerison, H. J. (1985). Animal intelligence as encephalization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 308(1135), 21-35.

- Kazu, R. S., Maldonado, J., Mota, B., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2014). Cellular scaling rules for the brain of Artiodactyla include a highly folded cortex with few neurons. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 128.
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). 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), 31052-31061.
- Komárek, S. (2008). Příroda a kultura. *Svět jevů a svět interpretací*. Praha: Academia.
- Kotrschal, A., Rogell, B., Bundsen, A., Svensson, B., Zajitschek, S., Brännström, I., ... & Kolm, N. (2013). Artificial selection on relative brain size in the guppy reveals costs and benefits of evolving a larger brain. *Current Biology*, 23(2), 168-171.
- Kruska, D. (1970). Vergleichend cytoarchitektonische Untersuchungen an Gehirnen von Wild-und Hausschweinen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 131(4), 291-324.
- Kruska, D., & Röhrs, M. (1974). Comparative-quantitative investigations on brains of feral pigs from the Galapagos Islands and of European domestic pigs. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 144(1), 61-73.
- Kruska, D. (1975). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. I. Comparison of volume of total brain and classical brain parts. *Journal für Hirnforschung*, 16(6), 469-483.
- Kruska, D., & Schott, U. (1977). Comparative-quantitative investigations of brains of wild and laboratory rats. *Journal für Hirnforschung*, 18(1), 59-67.
- Kruska, D. (1987). How fast can total brain size change in mammals?. *Journal für Hirnforschung*, 28(1), 59-70.
- Kruska, D. (1988). Effects of domestication on brain structure and behavior in mammals. *Human Evolution*, 3(6), 473-485.
- Kruska, D. (1996). The effect of domestication on brain size and composition in the mink (*Mustela vison*). *Journal of Zoology*, 239(4), 645-661.

- Kruska, D. C. (2005). On the evolutionary significance of encephalization in some eutherian mammals: effects of adaptive radiation, domestication, and feralization. *Brain, behavior and evolution*, 65(2), 73-108.
- Kruska, D. C. (2007). The effects of domestication on brain size. In 'Evolution of Nervous Systems. Vol. 3'.(Ed. JH Kaas.) pp. 143–153.
- Larson, G., Karlsson, E. K., Perri, A., Webster, M. T., Ho, S. Y., Peters, J., ... & Comstock, K. E. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8878-8883.
- Lefebvre, L., Reader, S. M., & Sol, D. (2004). Brains, innovations and evolution in birds and primates. *Brain, behavior and evolution*, 63(4), 233-246.
- Leybold A (2000). Vergleichend quantitative Untersuchungen an Gehirnen von Wild- und Labortieren der Art *Meriones unguiculatus* Milne- Edwards, 1867 (Mongolische Rennmaus). Diss. Thesis, Math.-Naturwiss. Fak., Universität Kiel.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., ... & Mauceli, E. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803.
- Mace, G. M., Harvey, P. H., & Clutton-Brock, T. H. (1981). Brain size and ecology in small mammals. *Journal of Zoology*, 193(3), 333-354.
- MacLean, E., Snyder-Mackler, N., & Serpell, J. (2019). Highly heritable and functionally relevant breed differences in dog behavior. *BioRxiv*, 509315.
- Marhounová, L., Kotrschal, A., Kverková, K., Kolm, N., & Němec, P. (2019). Artificial selection on brain size leads to matching changes in overall number of neurons. *Evolution*.
- Marshall, L. G., Webb, S. D., Sepkoski, J. J., & Raup, D. M. (1982). Mammalian evolution and the great American interchange. *Science*, 215(4538), 1351-1357.
- Mecozzi, B., Iurino, D. A., Berte, D. F., & Sardella, R. (2017). *Canis mosbachensis* (Canidae, Mammalia) from the Middle Pleistocene of Contrada Monticelli (Putignano, Apulia, southern Italy). *B. Soc. Paleontol. Ital*, 56, 72.
- Miklósi, Á. (2014). *Dog behaviour, evolution, and cognition*. oUp Oxford.

- Miller, D. J., Balam, P., Young, N. A., & Kaas, J. H. (2014). Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 36.
- Mink, J. W., Blumenshine, R. J., & Adams, D. B. (1981). 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), R203-R212.
- Moehlman, P. D., & Hofer, H. (1997). Cooperative breeding, reproductive suppression, and body mass in canids. *Cooperative breeding in mammals*, 76-128.
- Moody, J. A., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2006). Canine history and breed clubs. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES*, 44(1).
- Mortera, P., & Herculano-Houzel, S. (2012). Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, 45.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
- Ngwenya, A., Nahirney, J., Brinkman, B., Williams, L., & Iwaniuk, A. N. (2017). Comparison of estimates of neuronal number obtained using the isotropic fractionator method and unbiased stereology in day old chicks (*Gallus domesticus*). *Journal of neuroscience methods*, 287, 39-46.
- Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R. K., Porteš, M., Fitch, W. T., Herculano-Houzel, S., & Němec, P. (2016). Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), 7255-7260.
- Ostrander, E. A., & Wayne, R. K. (2005). The canine genome. *Genome research*, 15(12), 1706-1716.
- Palazzi, X. (2011). The beagle brain in stereotaxic coordinates. In *The Beagle Brain in Stereotaxic Coordinates* (pp. 1-115). Springer, New York, NY.
- Palombo, M. R., Kohler, M., Sola, S. M., & Giovinazzo, C. (2008). Brain versus body mass in endemic ruminant artiodactyls: a case studied of *Myotragus balearicus* and smallest *Candiacervus* species from Mediterranean Islands. *Quaternary International*, 182(1), 160-183.

- Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., ... & Kruglyak, L. (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *science*, *304*(5674), 1160-1164.
- Parker, H. G., Dreger, D. L., Rimbault, M., Davis, B. W., Mullen, A. B., Carpintero-Ramirez, G., & Ostrander, E. A. (2017). Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell reports*, *19*(4), 697-708.
- Pérez-Barbería, F. J., Shultz, S., & Dunbar, R. I. (2007). Evidence for coevolution of sociality and relative brain size in three orders of mammals. *Evolution*, *61*(12), 2811-2821.
- Plogmann, D., & Kruska, D. (1990). Volumetric comparison of auditory structures in the brains of European wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa* f. dom.). *Brain, Behavior and Evolution*, *35*(3), 146-155.
- Radinsky, L. (1971). An example of parallelism in carnivore brain evolution. *Evolution*, 518-522.
- Radinsky, L. (1973). Evolution of the Canid Brain; pp. 169–185. *Brain, Behavior and Evolution*, *7*(3), 169-185.
- Pierotti, R. J., & Fogg, B. R. (2017). *The first domestication: How wolves and humans coevolved*. Yale University Press.
- Price, E. O. (2002). *Animal domestication and behavior*. Cabi.
- Ratcliffe, J. M., Fenton, M. B., & Shettleworth, S. J. (2006). Behavioral flexibility positively correlated with relative brain volume in predatory bats. *Brain, behavior and evolution*, *67*(3), 165-176.
- Roberts, T., McGreevy, P., & Valenzuela, M. (2010). Human induced rotation and reorganization of the brain of domestic dogs. *PloS one*, *5*(7), e11946.
- Röhrs, M., & Ebinger, P. (1999). Wild is not really wild: brain weight of wild domestic mammals. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *112*(6-7), 234-238.
- Sablin, M., & Khlopachev, G. (2002). The earliest Ice Age dogs: evidence from Eliseevichi. *Current Anthropology*, *43*(5), 795-799.
- Sarko, D. K., Catania, K. C., Leitch, D. B., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2009). Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in neuroanatomy*, *3*, 8.

- Savolainen, P., Zhang, Y. P., Luo, J., Lundeberg, J., & Leitner, T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298(5598), 1610-1613.
- Serpell, J. A., & Hsu, Y. A. (2005). Effects of breed, sex, and neuter status on trainability in dogs. *Anthrozoös*, 18(3), 196-207.
- Schleifenbaum, C. (1973). The postnatal development of the brain of poodles and wolves (author's transl). *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 141(2), 179-205.
- Schmutz, S. M., & Berryere, T. G. (2007). Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal genetics*, 38(6), 539-549.
- Smaers, J. B., & Soligo, C. (2013). Brain reorganization, not relative brain size, primarily characterizes anthropoid brain evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1759), 20130269.
- Smith, B. P., Lucas, T. A., Norris, R. M., & Henneberg, M. (2018). Brain size/body weight in the dingo (*Canis dingo*): comparisons with domestic and wild canids. *Australian journal of zoology*, 65(5), 292-301.
- Sol, D., Duncan, R. P., Blackburn, T. M., Cassey, P., & Lefebvre, L. (2005). Big brains, enhanced cognition, and response of birds to novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5460-5465.
- Sillero-Zubiri, C., & Macdonald, D. W. (Eds.). (2004). *The biology and conservation of wild canids*. Oxford: Oxford University Press.
- Sillero-Zubiri, C. (2009). Family Canidae. In D. E. Wilson & R. A. Mittermeier (Eds.), *Handbook of the mammals of the world. Vol. 1. Carnivores* (pp. 352–446). Barcelona, Spain: Lynx Ed.
- Sol, D., Bacher, S., Reader, S. M., & Lefebvre, L. (2008). Brain size predicts the success of mammal species introduced into novel environments. *the american naturalist*, 172(S1), S63-S71.
- Team, R. C. (2016). R: a language and environment for statistical computing. R Core Team, Vienna, Austria.

- Tedford, R. H., Wang, X., & Taylor, B. E. (2009). Phylogenetic systematics of the North American fossil caninae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2009(325), 1-218.
- Tonoike, A., Nagasawa, M., Mogi, K., Serpell, J. A., Ohtsuki, H., & Kikusui, T. (2015). Comparison of owner-reported behavioral characteristics among genetically clustered breeds of dog (*Canis familiaris*). *Scientific reports*, 5, 17710.
- Tower, D. B. (1954). 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), 19-51.
- Trut, L. N. (1999). Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment: Foxes bred for tamability in a 40-year experiment exhibit remarkable transformations that suggest an interplay between behavioral genetics and development. *American Scientist*, 87(2), 160-169.
- Uemura, E. E. (2015). *Fundamentals of canine neuroanatomy and neurophysiology*. John Wiley & Sons.
- Vaughan, T. A., Ryan, J. M., & Czaplewski, N. J. (2000). *Mammalogy*, 4th edn. Thomson Learning. Inc., New York, 565.
- Wang, X., & Tedford, R. H. (2008). *Dogs: their fossil relatives and evolutionary history*. Columbia University Press.
- Wayne, R. K. (1986). Cranial morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *Evolution*, 40(2), 243-261.
- Wayne, R. K., Van Valkenburgh, B., & O'Brien, S. J. (1991). Molecular distance and divergence time in carnivores and primates. *Molecular Biology and Evolution*, 8(3), 297-319.
- Wesley-Hunt, G. D., & Flynn, J. J. (2005). Phylogeny of the Carnivora: basal relationships among the carnivoramorphan, and assessment of the position of 'Miacoidea' relative to Carnivora. *Journal of Systematic Palaeontology*, 3(1), 1-28.
- Whiting, B. A., & Barton, R. A. (2003). The evolution of the cortico-cerebellar complex in primates: anatomical connections predict patterns of correlated evolution. *Journal of Human Evolution*, 44(1), 3-10.

- Wilcox, B., & Walkowicz, C. (1995). *Atlas of Dog Breeds of the World*. TFH Publications.
- Wilkins, A. S., Wrangham, R. W., & Fitch, W. T. (2014). The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, *197*(3), 795-808.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. M. (Eds.). (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 1). JHU Press.
- Zhang, K., & Sejnowski, T. J. (2000). A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5621-5626.
- Zrzavý, J., Duda, P., Robovský, J., Okřínová, I., & Pavelková Řičánková, V. (2018). Phylogeny of the Caninae (Carnivora): Combining morphology, behaviour, genes and fossils. *Zoologica Scripta*, *47*(4), 373-389.