

Válasz Dr. Haller József bírálataira

Jelölt: Dr. Kubinyi Enikő

Az értekezés címe: Behavioural, neural and genetic patterns related to age or lifespan in companion dogs

Köszönöm Dr. Haller Józsefnek, hogy elvállalta az értekezés bírálását, kiemelte előnyeit és rámutatott hiányosságokra. Az alábbiakban a bírálat rövid összefoglalását követően az értekezéssel kapcsolatban feltett kérdésekre és felvetésekre válaszolok, követve a bíráló által megadott kérdéssorrendet.

A bírálat rövid összefoglalása

A jelölt az öregedés folyamatainak vizsgálatát tűzte ki célul. Megalapította a Szenior Családi Kutya Programot, amelynek keretén belül nagy számú hazai, sőt külföldi kutya gazdát vont be a kutatásaiba, és munkatársaival együtt az elmúlt egy évtizedben rendkívül értékes munkát végzett. A disszertációban összefoglalt kutatások kivétel nélkül magasan jegyzett, úgynevezett Q1 kategóriás lapokban jelennek meg, és összefüggő egészet képeznek. Kutatásainak relevanciáját Dr. Kubinyi Enikő két megközelítésben értelmezi. Egyrészt meggyőzően érvel amellett, hogy a kutyák öregedése nagyon jó modellje az emberi öregedésnek, amit az ember és a kutya közös evolúciós múltjából vezet le. Másrészt hasonló meggyőző erővel tulajdonít önálló fontosságot a kutyák tanulmányozásának, amit a családi kutyák nagy számával, illetve e kutyáknak az ember életében betöltött fontos szerepével indokol. A bíráló úgy véli, hogy a jelölt kiváló munkát végez egy fontos területen, amit publikációinak nemzetközi visszhangja is bizonyít. A bíráló úgy értékeli, hogy a jelölt következtetései (az alább felsorolt) hibák ellenére érvényesek, kivéve a genetikai vizsgálatokat, ahol túlságosan nagy a bizonytalansági faktor.

A bíráló kérdései és az ezekre adott válaszok

Az alábbiakban a bírálatban megjelölt hiányosságokra és a feltett kérdésekre válaszolok. Az opponensi kérdéseket félkövér szedéssel emeltem ki.

1. A statisztikai elemzés kiegyensúlyozatlan és nem mindig felel meg tökéletesen a célnak. A bírálónak az a benyomása, hogy a kutatás alakulása/fejlődése során a jelölt statisztikai eszköztára fokozatos fejlődésen ment keresztül, és a nagyon egyszerű „t”-statisztikától fokozatosan jutott el a több-faktoros elemzésekig, illetve a gépi tanulás elemeinek beépítéséig az elemzésbe. E fejlődés nyilván impresszív, de azt eredményezi, hogy az alacsonyabb sorszámú fejezetek következtetései inadekvát statisztikán alapulnak. Ott, ahol több-faktoros elemzésre lett volna szükség, a jelölt egyszerű „t” illetve chi-négyzet statisztikát használt. Az adatok jellege talán magyarázhatná a jelölt statisztikai megközelítését, de a 11. fejezetben a jelölt több-faktoros megközelítést alkalmaz ugyanolyan jellegű adatokra, amilyenekre a 7. és 8. fejezetekben nagyon egyszerű statisztikát alkalmazott.

VÁLASZ: Az értekezés több mint tíz év kutatásait mutatja be, amelyek a szakterület elismert lapjaiban jelentek meg, és az akkori elvárásoknak megfelelő szintet képviseltek. Az elmúlt időszakban valóban fejlődött a statisztikai tudásom, másrészt a szerzőtársaim is sok új módszert hoztak be a kutatócsoportunkba. Nem vitatva, hogy több esetben biztosan lehetett volna – vagy célszerű lett volna – többfaktoros megközelítést alkalmazni, úgy gondolom, hogy az elemszám és az eloszlások alapján az „egyszerű” tesztek is alkalmasak voltak a feltett kérdéseink megválaszolására.

2. A disszertáció nem mentes a tautológiától. A 7. fejezetben például a kognitív leépülésre vonatkozó tesztkérdések közül kizárta azokat, amelyek pontszámai nem korreláltak szignifikánsan az életkorral – így nyilván könnyebb volt összefüggést találni az öregedés és kognitív leépülés között, mint akkor, ha minden tesztkérdést figyelembe vett volna. Hellyel-közzel – például a 9. fejezetben is – található még ilyen önmagát magyarázó gondolatmenet.

VÁLASZ: A 7. fejezetben ismertetett kutatással két célunk volt. Az egyik egy széles körben használt kérdőív belső konzisztenciájának vizsgálata. Problémásnak tartottuk, hogy a kutyák kognitív diszfunkciójának

diagnózisára használt kérdőívben (CADES, pl. Madari et al. 2015) úgy adnak össze pontszámokat, hogy az eljárást nem támasztja alá az egyes kérdések egymással való (szoros) kapcsolata, vagyis nincs adat a kérdőívskálák belső konzisztenciájáról (internal consistency, általában Cronbach's alpha-val (CA) adják meg). A magyar mintán elvégzett vizsgálatunk igazolta a gyanúkat, ami szerint a kérdések nem felcserélhetők egymással, ugyanis egy skálán belül a kérdések nem függenek össze (alacsony volt a CA). Ezért véleményünk szerint hiba volt őket skálaként kezelni a korábbi vizsgálatokban. A másik célunk pedig az volt, hogy a CADES kérdőív kérdéseiből nagy belső konzisztenciájú, korral összefüggő változásokat mérő skálát hozzunk létre. Ehhez logikus lépés volt azt megnézni, mely kérdések függenek össze leginkább a korral. Az általunk létrehozott skála tehát megbízhatóan méri az öregedés több doménre kiterjedő hatását, mert minden kérdése összefügg a korral. Nem állítjuk azt, hogy alkalmas a kognitív diszfunkció diagnosztizálására, ezért is neveztük el „korral összefüggő változásoknak” (age-related changes, ARC) a skálát.

3. Az öregedés mértékének mérőszáma nem egységes. Az általános bevezetésben a jelölt részletesen leírja, hogy a várható életkor különböző tényezőktől – például a kutya méretétől – függ, ezért szakirodalmi javaslatok alapján egy relatív öregedési mutatót használ csaknem az egész disszertációban. Ettől azonban eltér a 9. fejezet, ahol az öregség jelének az abszolút – években kifejezett – életkort tekinti, saját indoklása szerint azért, mert a kutatásban részt vevő kutyák mérete (testsúlya, marmagassága) kiegyensúlyozott volt. Az alanyok leírásából azonban kiderül, hogy a legkisebb kutya alig 6, míg a legnehezebb 78 kg testsúlyú, ugyanakkor a legalacsonyabb 27, míg legmagasabb 84 cm marmagasságú volt. Ezek jókora különbségek, és nem indokolják az öregedés mérőszámának egyszerűsített kezelését. Az is megjegyzendő, hogy a keverék, illetve fajtatiszta kutyák öregedési fázis-besorolása más elvek szerint történt, ami szintén problematikus.

VÁLASZ: A két vizsgálatban azért kezeltük másként az öregedés mérőszámát, mert más volt a kérdésünk. A 7. fejezetben arra voltunk kíváncsiak, hogy a kutyapopuláció öt korcsoportját reprezentáló mintánkban milyen képet mutat a „korral összefüggő változások” skálánk értéke. Előre nem tudtuk, hogy milyen mintázat várható (pl. sokáig konstans és csak késői letörés van benne), ezért hasonlítottunk össze korcsoportokat és nem folytonos változóként használtuk a kort. A korcsoportok képzéséhez a relatív kort használtuk, amit azért tettünk, hogy az idős korcsoportban is legyenek nagytestű kutyák. Mivel a nagytestűek, például a német dog várható élettartama 7-8 év, a kistestűeké akár 15, ezért, ha a kronológiai kor alapján csoportosítunk, az idősek között várhatóan főleg kistermetűek lettek volna, amit el akartunk kerülni, így a relatív kort használtuk.

A 9. fejezetben más volt a kérdésünk, itt nem öt, hanem csak két csoportot, idős és fiatal kutyákat szerettünk volna összehasonlítani. A viselkedéstudományhoz 10-45 kg-os kutyákat kerestünk, hogy ne kelljen számolni a tömeggel összefüggő várható életkor hatásával. Amikor nem sikerült a tervezett létszámot feltölteni, elfogadtunk 10 jelentkezőt más súlycsoportoktól is. Ez azonban nem torzította a mérést. Az idős és a fiatal kutyák csoportjában továbbra is 90%-ban közepes termetű kutyák voltak. A 107 kutyából 9 (8%) volt 10 kg alatt, 97 (91%) esett a 10-45 kg-os súlycsoportba (ebből csak 13 kutya volt 30 kg feletti). Az egyetlen 45 kg-nál súlyosabb kutya idős volt. Így a 7. fejezetben megfogalmazott aggodalmunk, ami szerint az idős kutyák közt korai elhalálozásuk miatt kevesebb a nagy termetű, ha a kronológiai kort használjuk a csoportosításra, az aktuális mintánkban nem okozhatott gondot. Egy újabb vizsgálat egyébként cáfolta, hogy a kognitív öregedés trajektóriájában eltérés lenne a méretcsoportok között (Watowich et al. 2020). Saját, folyamatban lévő munkánk is ezt erősíti (Turcsán et al., in prep.).

4. A genetikai vizsgálatok következtetései nem megalapozottak. A bíráló tisztában van azzal, hogy – a jelölt szóhasználatával – „matuzsálemi” kutyák bevonása egy tudományos vizsgálatba nem egyszerű, és azzal is, hogy a genetikai vizsgálatok költségesek, és munkaerő igényesek. Ez azonban nem teszi tudományosan értelmezhetővé mindössze két alany genetikai vizsgálatát. Az emberen és más fajokon lebonyolított vizsgálatok közötti rengeteg ellentmondás egyértelművé teszi, hogy még a sok-ezres mintaszámú genetikai vizsgálatok eredményei is szélsőségesen bizonytalanok. Ez így van olyan tulajdonságokkal is, amelyek az öregedésnél kevésbé összetett genetikai háttérrel rendelkeznek.

VÁLASZ: A két extrém idős kutya teljes genom szekvenciáját több mint 850, átlagos életkorú kutyaéval vetettük össze. A vizsgálatnál elsősorban a módszer kidolgozása volt a célunk, és ez már a címben is

jeleztük (Preliminary investigations...). A megjelent cikk híre azóta segítette a mintagyűjtést, többek között az USA-ból is kaptunk már mintát. Jelenleg további mintákat gyűjtünk, és ha legalább 8 összegyűlik, megismételjük a vizsgálatot. Ismereteink szerint a humán vizsgálatokban sem dolgoznak jelentősen nagyobb extrém idős (100 évesnél idősebb, „centenarian”) elemszámmal. Néhány példa a 100 év feletti elemzésre: 6 (Han et al. 2013), 19 (Cheng et al. 2019), 2 (Ye et al. 2013). Utóbbi példa azért is érdekes, mert csak itt végeztek teljes genom asszociációs vizsgálatot (GWAS).

5. Egyéb hiányosságok.

A 7. fejezetben a jelölt változónként tüntette fel a hiányzó adatok mennyiségét, de nem tisztázta, hogy a hiányzó adatokat hogyan kezelték, illetve, hogy hány alanynál sikerült regisztrálni az összes adatot.

VÁLASZ: Ebben a vizsgálatban két kérdőív adatait fésültük össze, és sajnos az elsőben még nem kérdeztük meg a gazdától a kutyák tömegét és magasságát, ezért kénytelenek voltunk a fajtastandardra szorítkozni, keverékeknél pedig ezek az adatok hiányoztak. Emiatt a GLM elemzésben összesen 803 kutya adatait elemeztük. Ez az információ kimaradt az értekezésből, amikor a publikáció (Szabó et al. 2018) GLM táblázatának értékeit rövidítési céllal folyószövegben adtam meg. A skálák belső konzisztenciájának kiszámolásához 1343 kutya adatát használtuk.

A 9. fejezetben az idős és fiatal kutyák tesztelése egymást követte időben, az csoportok adatfelvételére tehát különböző időpontokban került sor. Ez technikailag kifogásolható.

VÁLASZ: Egymástól elkülönülten teszteltük a két korcsoportot, mivel több vizsgálat épült egymásra és szervezési okokból nem tudtuk máshogy megoldani a tesztelést. Viszont a tesztelések mindkét csoportban több évszakban zajlottak, beltéren, és volt köztük 1 hónap átfedés (idősek: 2016. 12. 01 - 2017. 09. 16. és fiatalok: 2017. 08. 11 – 2017. 12. 19).

A 10. fejezetben a hangok emocionális tónusa emberi tesztelés alapján lett meghatározva, és nincs bizonyíték arra, hogy a kutyák ugyanolyan emóciókat tulajdonítanak a hangoknak, mint az emberek – legalábbis a felhasznált hanganyagra nézve nincs.

VÁLASZ: Korábbi vizsgálatok szerint a kutyákra az emberekhez hasonlóan hat a negatív hangok érzelmi színezete (valenciája), mivel több stresszel kapcsolatos viselkedést mutattak negatív hangok lejátszása után, mint pozitív és nem-érzelmi hangokat követően (Huber et al. 2017). Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy a kutyák a fajtárs- és emberarcokon megjelenő pozitív és negatív érzelmeket megfelelően társították pozitív és negatív hangokkal a nézési paradigma alapján (Albuquerque et al. 2016). Munkatársaim fMRI vizsgálatokkal is megerősítették, hogy a kutya- és emberagy hasonló mechanizmussal dolgozza fel a különböző érzelmi színezetű hangokat (Andics et al. 2014), igazolva, hogy a hangok érzelmi színezetét meghatározó akusztikus szabályok hasonló hatást váltanak ki a különböző fajokban, illetve hasonló motiváció áll mögöttük (Morton 1977). Ennek alapján megalapozottnak látjuk, hogy az emberi teszteléssel meghatározott pozitív és negatív érzelmi színezetű hangokhoz a kutyák hasonló emóciókat társítanak, mint az emberek.

A 11 fejezetben megjelenik egy új kontraszt, a rövid és hosszú fejű kutyáké, ami korábban nem szerepelt a vizsgálatokban, sőt az egyik vizsgálat kísérőszövegéből kiderült, hogy a rövidfejű kutyák gazdái kevés hajlandóságot mutattak a kutatásban való részvételre. Mivel e kísérlet eredményei elsősorban a fej hosszával hozhatók összefüggésbe, kérdéses a jelentőségük az öregedés kutatásának szempontjából.

VÁLASZ: E vizsgálatban pontosan ugyanannyi rövid és hosszúfejű kutya vett részt. Valóban, nem ez volt a legjelentősebb eredményünk az öregedéssel kapcsolatban. Mindössze azt az eredményt kaptuk, hogy az idős kutyák lassabban közelítik meg a táplálékot és az adekvát kontroll hiánya miatt azt sem tudjuk pontosan, hogy ennek mi az oka.

A vizsgálatban azért elemeztük a kor hatását, mert korábbi kutatások alapján azt vártuk, hogy a korrallal csökken a kutyák szociális figyelme (Chapagain et al. 2017), és kíváncsiak voltunk, ez a hatás megfigyelhető-e mind a rövid-, mind a hosszúfejűekben. E kérdés azért érdekes, mert a retinális ganglionsejtek eloszlása, ami a látótér középpontjában lévő látásélesség indikátora, más a rövidfejű kutyákban, mint a hosszúfejűekben (McGreevy et al. 2004). Ezt a feltételezést nem tudtuk a kutatási

eredményeinkkel megerősíteni.

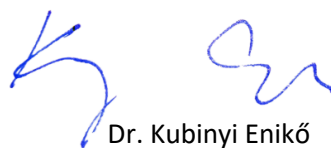
Végezetül a 16. fejezetben az egyes viselkedéseknek tulajdonított neurális háttér egyszerűsített, némileg célzatos, és erősen hipotetikus.

VÁLASZ: A 16. fejezetben 155 kutya poliszomnográfias vizsgálat során mért alvási orsó paramétereit vetettük össze a kutyák kronológiai korával, viselkedést nem vizsgáltunk. A viselkedéseknek tulajdonított neurális háttér az itt ismertettnél bővebben foglaltuk össze a 2021-ben, a Biological Reviews-ban megjelent irodalmi szemlénkben (Iotchev and Kubinyi 2021) és Ivaylo Iotchev PhD disszertációjában (Iotchev 2020).

Irodalomjegyzék

- Albuquerque N, Guo K, Wilkinson A, et al (2016) Dogs recognize dog and human emotions. *Biol Lett* 12:20150883. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0883>
- Andics A, Gácsi M, Faragó T, et al (2014) Voice-sensitive regions in the dog and human brain are revealed by comparative fMRI. *Curr Biol* 24:574–578. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.058>
- Chapagain D, Virányi Z, Wallis LJ, et al (2017) Aging of Attentiveness in Border Collies and Other Pet Dog Breeds: The Protective Benefits of Lifelong Training. *Front Aging Neurosci* 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00100>
- Cheng A, Leung Y, Crawford JD, et al (2019) The psychological health of 207 near-centenarians (95–99) and centenarians from the Sydney Centenarian Study. *Aust N Z J Psychiatry* 53:976–988. <https://doi.org/10.1177/0004867419848831>
- Han J, Ryu S, Moskowitz DM, et al (2013) Discovery of novel non-synonymous SNP variants in 988 candidate genes from 6 centenarians by target capture and next-generation sequencing. *PLoS One* 8:478–485
- Huber A, Barber ALA, Faragó T, et al (2017) Investigating emotional contagion in dogs (*Canis familiaris*) to emotional sounds of humans and conspecifics. *Anim. Cogn.* 1–13
- Iotchev I (2020) The dog as a model-animal in comparative sleep spindle. PhD Thesis, Eötvös Loránd University
- Iotchev IB, Kubinyi E (2021) Shared and unique features of mammalian sleep spindles – insights from new and old animal models. *Biol Rev* 96:12688. <https://doi.org/10.1111/brv.12688>
- Madari A, Farbakova J, Katina S, et al (2015) Assessment of severity and progression of canine cognitive dysfunction syndrome using the CANine DEmentia Scale (CADES). *Appl Anim Behav Sci* 171:138–145. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.034>
- McGreevy P, Grassi TD, Harman AM (2004) A Strong Correlation Exists between the Distribution of Retinal Ganglion Cells and Nose Length in the Dog. *Brain Behav Evol* 63:13–22. <https://doi.org/10.1159/000073756>
- Morton ES (1977) On the Occurrence and Significance of Motivation-Structural Rules in Some Bird and Mammal Sounds. *Am Nat* 111:855–869. <https://doi.org/10.1086/283219>
- Szabó D, Miklósi Á, Kubinyi E (2018) Owner reported sensory impairments affect behavioural signs associated with cognitive decline in dogs. *Behav Processes* 157:354–360. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.07.013>
- Watowich MM, MacLean EL, Hare B, et al (2020) Age influences domestic dog cognitive performance independent of average breed lifespan. *Anim Cogn* 23:795–805. <https://doi.org/10.1007/s10071-020-01385-0>
- Ye K, Beekman M, Lameijer EW, et al (2013) Aging as accelerated accumulation of somatic variants: Whole-genome sequencing of centenarian and middle-aged monozygotic twin pairs. *Twin Res Hum Genet* 16:1026–1032. <https://doi.org/10.1017/thg.2013.73>

Budapest, 2021. március 29.



Dr. Kubinyi Enikő
eniko.kubinyi@ttk.elte.hu