

KUBINYI ENIKŐ

*„Életkorral, élethosszal összefüggő viselkedési, agyi és genetikai mintázatok
kutyákban”*

című akadémiai doktori értekezésének bírálata

A téma jelentősége

A kutyák különös evolúciós utat jártak be. Történetük több mint tízezer éve elvált a farkasokétól, de ezzel egyidejűleg szorosan összekapcsolódott az emberével. Ennek következtében, a széleskörűen elfogadott álláspont szerint, számos tulajdonságuk, pl. szociális képességek, az emberhez kötötten evolválódott. A közös történet szintén fontos végkifejlete, hogy a kutya az ember egyik legközelebbi társává vált, manapság már a háztartások jelentős részében van kutya. E szoros kapcsolat következménye, hogy a kutyát az emberhez nagyon hasonló evolúciós és környezeti hatások érték/érik. Emiatt felmerül az a lehetőség, hogy a kutyák tanulmányozásával nagyon sok, az emberre is érvényes ismeret juthatunk. Kubinyi Enikő doktori műve e felismerésre támaszkodva azt próbálja bemutatni, hogy a kutyák sokoldalú vizsgálatával hogyan lehet közelebb jutni az emberi öregedés jobb megértéséhez.

A téma fontosságát és időszerűségét azt hiszem nem lehet túlhangsúlyozni. A modern nyugati társadalmakban már jelenleg is, de hamarosan globálisan is az egyik legfontosabb szociális probléma lesz a társadalom egyre nagyobb mértékű elöregedése. Éppen ezért nagyon fontos, hogy megértsük az öregedés folyamatát, és különösen azt, hogy hogyan növelhetjük meg az egészségben töltött évek számát. De a kutyák öregedésének vizsgálata önmagában is fontos, hiszen az utóbbi évtizedek folyamatai, pl. állatjóléti mozgalmak térnyerése vagy az állatgyógyászati technikák tökéletesedése, ahhoz vezettek, hogy az idős kutyák létszáma is jelentősen nőtt. Ez, a gazda és kutya közötti erős érzelmi kötelékek miatt, illetve az állatorvosi kezelések költségessége miatt, szintén azzal járt, hogy egyre fontosabbá válik az öregedő kutyák egészségben töltött éveinek növelése.

Észrevételek, megjegyzések

Kubinyi Enikő rendkívül széles, a kérdőíves vizsgálatoktól, az etológiai kísérleteken át, a legmodernebb (pl. GPS, fMRI) technikák használatáig terjedő metodikai spektrumot felölelő vizsgálat sorozat bemutatásával próbálja meggyőzni az olvasót, hogy a kutyák ideális alanyai, új modellszervezetei lehetnek az emberi öregedés megértését célzó kutatásoknak. Ez a meggyőzés nagyrészt sikerül, de azért számos probléma árnyalja a képet.

Nézetem szerint egy ilyen gond, hogy a jelölt a legtöbb vizsgálatnál túlhangsúlyozza az öregedésre, pontosabban a kor hatására vonatkozó eredményeit, sokszor más, egyszerűbb alternatív magyarázatok, szerintem nem tudatos, figyelmen kívül hagyásával, vagy nem véve figyelembe az eredmények statisztikai jellemzőit. Ez utóbbira példa a kutyák mozgásmintázatának vizsgálata, ahol a kapott mintázat elég általános érvényűnek van beállítva (pl. 175. o.), annak ellenére, hogy az eredmények egyetlen kutyacsoport, igaz részletes, vizsgálatából

származnak. Hasonló jellegű hatása van az olvasóra annak is, amikor 1-2%-nyi varianciát magyarázó változók fontosságát hangsúlyozza a jelölt. A vizsgálatok korrelatív voltának figyelembe vétele is többször hiányzik, például amikor a jelölt megállapítja, hogy "idős korban a célzott játék, kiképzés ellensúlyozhatja a kutya képezhetőségének [korral való] csökkenését" (7. tézis, beszúrás tőlem). Ez az eredmény egy kérdőíves vizsgálatból származik, és egy alternatív magyarázat lehet, hogy azok a kutyák maradnak jobban képezhetők idős korban, akik amúgy is játékosabbak. Szintén nem válik a dolgozat előnyére, amikor a jelölt hosszan diszkusszál olyan korral kapcsolatos eredményeket, amik a dolgozatban nem kerültek bemutatásra (pl. 118. o.). A dolgozat jelentős mértékben támaszkodik a gazdákkal végzett kérdőíves vizsgálatokra, a 11 bemutatott kutatás közül 5 ilyen. Azonban ezen eredmények megvitatása során csak nagyon ritkán merül fel az, hogy itt a kutyákra vonatkozó információhoz a gazdák szűrőjén keresztül jutunk hozzá. Vagyis e vizsgálatok során nem a kutyákról tanulunk meg valamit, hanem a kutyákról a gazdáknál kialakult képről. És bár vannak utalások a dolgozatban arra, hogy a kérdőíveket próbálták empirikusan is validálni (pl. a dominanciára és kutyaszemélyiségre vonatkozó kérdőívek), a tisztánlátást ezen eredmények esetében nagyban növelte volna az, ha a jelölt alaposabban diszkusszálja ezen extra szűrő potenciális hatásait. Különösen annak fényében, hogy úgy tűnik, hogy a jelölt pl. megbízhatóbbnak tartja a kutyák méretének azok fajtáján alapuló becslését, mint a gazdák által szolgáltatott adatok használatát. Egy nagyon rossz indulatú bíráló még azt is felvethetné, hogy ezen az extra emberi szemüvegen keresztül nézve nem meglepő, hogy a kutya az emberi öregedés jó modelljének tűnik. Természetesen erről itt nincs szó, hiszen konkrét empirikus vizsgálatok is ez irányba mutatnak.

Többször előfordul, hogy a jelölt a bemutatott eredményeiből nem következő kijelentéseket tesz. Például azt állítja, hogy az idősebb kutyák lassabban közelítik meg a nekik bemutatott arcokat, mint a fiatalabb kutyák (173. o.). Azonban, e kísérletben nem szerepelt arc nélküli kontroll, így nem tudhatjuk, hogy csak az arcokat közelítik-e meg az idősebb kutyák lassabban, vagy bármi más is. Hasonlóan gyenge lábakon álló kijelentés az is, hogy a kutyák képesek az emberi érzelmeket megkülönböztetni. A kísérleti eredmények alapján ugyanis a kutyák nem tettek különbséget a semleges (köhögés) és pozitív érzelmeket kifejező (nevetés) hangok között. Ezen eredmény miatt merült fel bennem az is, hogy lehet-e ezt a vizsgálati eredményt a pozitívítási hatást megerősítő eredményként értelmezni. Nyilván itt a válasz attól is függ, mit ért a szakma pozitívítási hatás alatt.

Egy másik problémakör az adatok statisztikai elemzése és ezen eredmények értelmezése. Egy különösen fájó példa, amikor a jelölt az egyik kérdőíves vizsgálat (7. fejezet) eredményeinél azt találja, hogy a felmért jellegek nem konzisztensek egymással, és ezt úgy kezeli, hogy kiválasztja azokat a jellegeket, amelyek legerősebben korrelálnak a kutyák korával. Ezek után nem meglepő, hogy az így kiválasztott jellegek már erős konzisztenciát mutattak (vö. közös háttér változó) és a belőlük számított skála szintén kapcsolatban volt a korral.

Több vizsgálatban kapcsolatban felmerül a kérdés, hogy a jelölt miért nem a mért kor adatokat használja, miért konvertálja azokat ordinális változóvá. A pl. a 30. oldalon felvetett magyarázat, miszerint a kor ordinális változóként való kezelésével lehetőség van a kvadrátikus hatások kezelésére statisztikai/matematikai szempontból hibás (bővebben lásd a Részleteknél).

Több kísérlet is metodológiai problémától szenved, a fentebb említett arc nélküli kontroll hiánya egy ilyen eset. De megemlíthetem a 9. fejezet vizsgálatát is, ahol az idős és fiatal kutyák csoportja egymástól elkülönülten, időben egymás után volt tesztelve. Ez lehetetlenné teszi a kor és pl. az esetleges szezonális hatások elkülönítését.

A genom elemzések eredményeinek értelmezése sem teljesen egyértelmű. A jelölt két magyar kutyamatuszálem vizsgálata során abból indul ki, hogy a csak bennük közösen előforduló genetikai változatok (egy több száz kutya hasonló adatait tartalmazó adatbázissal összevetve) fontosak lehetnek az öregedés megértése szempontjából. Itt azonban elsikkad az a fontos körülmény, hogy mindkét vizsgált kutya Magyarországról származik, ami a valószínűsíthetően közelebbi leszármazási kapcsolatok (esetleg lokális adaptációk) miatt önmagában, a matuzsálemi kor megérésétől függetlenül is okozhatja csak e két kutyában megjelenő genetikai változatokat. Ezen alternatív magyarázat azonban könnyen kizárható, ha az összehasonlításra használt adatbázisban lennének más magyarországi kutyák is. Erről azonban nem tesz említést a szöveg. Ha az adatbázisban nincsenek más magyar kutyák, a közös származás hatása akkor is vizsgálható, nem magyarországi, de azonos területekről származó minták vizsgálatával.

Részletek

Az alábbiak a dolgozat olvasása közben bennem felmerült megjegyzések, kérdések és javaslatok. Mivel a dolgozat angolul íródott, ezért e pontok is angolul vannak. A dőlt betűvel szedett részek utalnak a dolgozat vonatkozó részeire. *Pxx*: az xx-ik oldalon; *pxb*: az x-ik paragrafus alulról (bottom) számolva; *lx-yt*: az x-y sorok, az adott paragrafuson belül felülről (top) számítva.

P5, p2b, l3t, "Taking this idea": this is a group selectionist argument (except the mention of relatives)

P5, sect.r: rather vague

P5, sect: I am unsure if this is really needed.

P12, p1b, l2-4t: So is this age median or mean? It does matter!

P14, p2b: Inconsistency. How much time owners spend with dog can influence health span vs shared activities between owners and dogs decreasing with dogs' age reducing the quality of dog-owner relationship. But how this second statement relates to dogs' lifespan which is suggested by the first statement?

P14, p1b, l2-3t: A quoted statement without reference.

P14, p1b, l5t, "lifestyle demographic factors": What does this mean?

P15, p2t, l2t: These methodological differences only make sense in questionnaire studies, but how one can trust these methods if they provide inconsistent results?

P15, p3t, l1t: uncapitalised start of sentence

P15, p3-5t: It is unclear, how these three paragraphs connect to the previous ones. They deal with dominance, but no effect of age...

P18, l1-2b, "which means humans live six times longer than man as $82/13 = 6$ ": 1) man -> dog, 2) $82/13 \neq 6$

P19, p3b, l2t: "overlooked" -> overlooked

P20, section 4.8: This section is as much about advantages as disadvantages, despite of its title.

P25, p1b: (i) Oldest known dog died at 29 lived 130% longer than average while investigated methuselah dog died at 27 lived 135% longer? (ii) What do you compared the genome of the methuselaha to.

P27, l2-4b: It is not a surprise if the whole (sum) is correlating with the parts.

P28, p1b, l2t: no reference added, "see o and o"

P28, l4-6b: Instead of using the relative age, why not enter age, weight and height separately into the models. Then a significant interaction between age and size would have indicated that size should be taken into account. Here you assume a priori that size has an effect.

P30, caption Table 1: Why do you use different methods to determine the height of dogs (purebred: from standards, mixed bred: from actual measurement)? This way you loose a lot of information and introduce an artificial difference between purebred and mixed bred dogs.

P30, top: Do you have actual weight measurement or this is also just estimated?

P30, p2b: Do you have any actual data of size (height and weight) for purebred dogs? If yes, would you get the same results if you repeat the analyses with the actual measurements?

P30, l2-4b: Having a quadratic effect of age has nothing to do with categorising dogs into age groups.

P31, p2t, l3-6t: I do not understand this categorisation. The reasons you mention here are those because of which you introduced relative age. Why do you need to loose even more information with this categorisation?

P31, p1b, l6-7t: If you select the variables most correlated with age then it is not a surprise if you have an age effect.

P31, p1b, l8t, "calculated the mean": over what?

P32, l2-13t: It is not surprising that you have a high consistency between these variables because all correlate with an underlying variable, the relative age.

P32, l13t: How meaningful is to calculate the mean of an ordinal variable? What's about the distributional properties of the data, how were the conditions of GLM fulfilled?

P32-35, Sec7.4: I am unsure of the results because of the statistical uncertainty. The reported trends are not very surprising, the effect of age would have been almost certain because of the choose of the variables.

P34-35, Figs 2, 3, 4: It would have been more informative to show SD instead of SE. SE with such a huge sample size is almost meaningless.

P36, p3t: Is their any relationship between age and level of sensory impairment?

P36, p3t, l9t: The finding that every sensory impairment showed relation with problematic behaviour might be explained by that all is related to age.

P36, l5-6b: Are there any correlation among the different types of sensory impairment?

P54, lit: The old and young dogs group were tested sequentially, that is effect of time cannot be separated from effect of age. How much time passed between the testing of the two groups?

P58, l2b: What does "50-NA" mean?

P62, p1-2b: It is unclear if these paragraphs are about only humans or animals too.

P65, p1b, l7t: What does "dog recovered" mean?

P65, p1b, l5b: Does this mean that all dogs heard all six stimulus sounds?

P66, p2b, l1ob: I have the feeling that sound ID should also be a random effect in this model.

P66, p2b, l3b: Why did you use 'dredge', instead simply entering these variables into the model? For adding sex, you certainly have enough degree of freedom.

P67, p2t: This is a bit strange. (i) Sound ID should have been included in the model as random effect. (ii) Having no differences between two sounds in these analyses does not mean that sound ID does not have an effect. This is especially true here, where you performed these analyses on a, as far as I understand, restricted dataset, hence decreased the power of the test to be able to find differences.

P67, p1b: This text and Figure 10 do not seem to match. The text suggests that the only difference between young and old dogs is that old dogs reacted more slowly to the negative sounds. This is supported by the confidence intervals. On the other hand, in Figure 10 the only "outlier" is the young dogs' reaction to negative sounds. What's going on here?

P69, Table 10: It is unclear why you did not included two way interactions in this model. A significant interaction between sound category and dog age would have been a clear cut sign that dogs of different age react differently to the different sound types...

P71, p2t: I am unsure if we can call these findings "age-related positivity effect". My reasons for this are as follows. (i) There were no differences between positive and neutral sound categories. (ii) According to Figure 10, the only difference is the young dogs' stronger response to negative sounds. So I would suggest to call these findings as age-related negativity effect. I am also questioning your suggestion that dogs are responding to emotions, because (i) they show no difference between neutral and positive stimuli and (ii) they may simply make a difference between fearful (your negative) stimuli and non-fearful (your neutral and positive) stimuli. In other words, your negative stimuli simply signal danger for them, while the other two ones are just not really interesting for them. The age difference can be explained by that older dogs already learned to ignore these danger signals, and/or, because of their lowered residual reproductive value, it is not worth paying strong attention towards their.

P71, p3t: This paragraph nicely mixes two levels of explanation: the Emotional Selectivity Theory is a functional explanation (Tinbergen's why), while the aging-brain model is a typical mechanistic explanation (Tinbergen's how). The notion that "dogs are less likely to reflect upon their longevity" does not exclude the possibility that such a behaviour can have evolved which takes into account the future. An obvious example is the terminal investment from life history studies. The mechanism behind such behaviour can be the aging brain. These two hypotheses are not alternatives which necessary exclude each other.

P84, p3t, 1t: You just cannot say, based on this study, that "females look at faces longer" because you do not have a significant sex effect and you only find this effect in minority of dogs (only in the unspecified group).

P85, p2t: An alternative explanation to brain damage is that older dogs have lowered metabolism meaning they are less motivated to eat.

P91, p2b, 14b: I have to mention that regression trees nowadays are considered as very sensitive to data. Deleting or adding just a few records can completely change their results.

P93, p2t, 4t: Degree of freedom should be given as a subscript to the symbol of the statistic and not to its value.

P95, 4b: It would be nice to have effect sizes, because with such a huge sample size almost everything can be significant.

P95, 2b: Figure 2 is not relevant here.

P96, p6t, 2b: Do you mean steeper instead of "stronger"?

P109, Table 17: This table contains the same information as Table 3 on page 40. These two tables should have been combined into one table.

P109, p2b, 3b: The text refers back to Table 1, but that table show data about a seemingly different dataset.

P109, 1b: Table 19 -> 18

P112, 1-3b: The reported range of Cronbach's alpha does not match with the listed values.

P116, Table 19: Numbers in P and FDR columns touch each other, difficult to read.

P114, 1-3b: Good practice rerunning models after excluding outliers. I like this.

P115, 17b, "quadratic distribution": (i) What you refers to here is not a distribution, it is a relationship, a function. (ii) Strictly speaking you cannot say that this relationship is quadratic because (a) you did not test for a quadratic term and (b) your independent variables is an ordered factor (with unequal ranges) for which the function of quadratic is not defined. You might say you have dome shaped relationship or something similar.

P117, p2b, 1t: "influences" is a too strong word here as it assumes, at least partial, causality. It's better to use correlates, co-varies.

P118, p2t, 2t: Results not presented, so why do you discuss this here? Gives the impression that you eagerly want to find an effect of age.

P118, p3t: You did not show any relevant results for the relationship between age and fear/anxiety (actually showing no relation) still discuss their relation at length.

P119, p2t, 1-2t: How? Figure 21B clearly shows that only the oldest age group differed from others in the case of Responsiveness to training. That is, there is no peak! Again discussing the nothing over a whole paragraph.

P121, p2t, 1-4b: That's a very bold statement, given you are speaking around 1% of variance explained.

P132, Table 21: (i) What is "preferred running speed"? Preferred by who? (ii) "Relative distance covered", relative to what?

P133, p5b, 3-5t: Checking normality for $n=5$ or $n=6$??

P133, p5b, 5t: Why did not you use Spearman's correlations through?

P135, 1-3t and P136, 2-4t: Sentences are the same.

P142, p4b, 2b: Figure "1" should be something else.

P145, caption of Fig 29, 2b: Table "2" should be something else.

P147-149: The description of these analyses is unclear. I had to think quite a while to figure out how you can have predicted variables from a binomial test. The problem is with this approach that you cannot consider several variables at once. A possible way out from this situation might be the use of log-linear models on contingency tables.

P153, p2b, l6b: reference error

P155, l1b: Why did you have the Cz electrode only active in 55.5% of cases?

P156, p1t: Characteristics of spindles (density, amplitude, frequency) are not defined.

P157, l2-5t: This can theoretically be done by including sex and reproductive status in the GLM below.

P157, l10t: Why didn't you include the interaction between age and reproductive status and the three way interaction too?

P157, l13t: Why did you use this Akaike criterion based decision here, why didn't you just remove all non-significant terms (except, main effects in significant interactions)?

P157, p1t, l6-9b: Did your data support this distinction, i.e. did you have a gap (a valley) in the histogram of spindle frequencies at around 13 Hz?

P157, p1t, l2-3b: How many data points were excluded?

P157, p1t: I guess you have multiple spindles measured for each subject. How were these entered into the analyses? Did you average them within subjects?

P157, section 16.4: (i) Does this mean that you could not find any effects on general spindle characteristics, i.e. when you did not separate spindles into fast and slow? (ii) It would have been nice to show effect sizes here, how much of the variances are explained by these models. (iii) Any adjustment for false discovery rate?

P160, Abstract, l1-5b: Interesting idea!

P164, Fig 34: Bottom of figure is missing.

P165, p3t: The high level of overlap in SNPs and indels can be resulted from the fact that both subjects were of Hungarian origin, i.e. they might share a more common history than other dogs in the databases. Do the databases contain dogs from Hungary? If yes then those genomes could help to eliminate this possibility.

P168, p1t, l3-9t: This makes no sense. Do you suggest that your two samples have many overlapping variants because both of them are very different from the reference genome? This might only be true if the possibility of being different is limited, but this is not the case here! A more plausible explanation for the high level of overlapping can be the more closely shared genetic history between these two dogs, both of which are of Hungarian origin.

P171, p1t: Did you extracted those genes that were affected by novel missense mutations in both subjects, but not necessarily by the same mutations? The same question also stands for pathways.

P171, p1b, l4t: I don't think so, see my comments above on Hungarian origins.

P173, p2b, l3-5b: This is an overly optimistic statement. As I pointed out above, the similar responses might have a common evolutionary reason, i.e an adaptation to decreasing residual reproductive value of life with age. But this adaptation must not be emerge by the same mechanisms in humans and dogs.

P173, l2b: Your experimental design was unable to investigate this because you did not have no-face control. This statement would have been supported by a significant interaction between face/no face treatment and age.

P174, p3t, l6-7t: Over simplified statement. Correctly: "older dogs were PERCIVED BY THEIR OWNERS TO BE calmer..."

P175, l5-7t: Do not forget, these results based on only one group.

P176, p1b, l1t: Why "Firstly"? Strong discrepancy between the start of this paragraph and the previous one.

P183, l1-2t: This sentence makes no sense.

P185, p1t: I have some doubt about the success of this project. RNA decays very quickly.

Tudományos eredmények

A fentebbi megjegyzések, észrevételek figyelembe vételével a dolgozat alább felsorolt eredményeit fogadom el új tudományos eredményeknek.

- 2. tézis: A kutyák élete során változó tartási sajátságok feltárása, különösen a traumatikus életesemények szerepe.
- 3. tézis: Hatékony tanulási teszt kidolgozása.
- 6. és 7. tézis: A kutyák személyiségfejlődésének vizsgálata.
- 8. tézis: A kutyák mozgásmintázatának nagy pontosságú elemzését lehetővé tévő módszerek kidolgozása, alkalmazhatóságának bizonyítása.
- 9. tézis: A kutyák dominancia viszonyai kor függésének vizsgálata.
- 10. tézis: A kutyák alváskori agyi tevékenysége vizsgálati módszereinek kidolgozása, a kutyák alvási orsóinak kor függő jellemzése.
- 11. tézis: Kutyamatuzsálemek genomjának szekvenálása, öregedéshez kapcsolható genetikai változatok azonosítása. Kiváltképpen tetszik az az idea, miszerint a különösen hosszú élet egyik fontos tényezője lehet az RNS szintézis finom szabályozása.

Nagyon fontos, kiemelendő erőssége a dolgozatnak, hogy a jelölt több innovatív, *state-of-the-art* technika (pl. GPS, EEG, fMRI) alkalmazását adoptálta kutyákra, melyek használata a jövőben számos nagy jelentőségű új kutatási irányt alapozhat meg.

Összegzés

A fentieket összegezve megállapítható, hogy Kubinyi Enikő egy jelentős, eredeti tudományos eredményekről beszámoló akadémiai doktori művet nyújtott be. A prezentált munka fontos értékének tartom, hogy számos területen villantja fel a jelentős új eredményekkel kecsegtető továbblépés lehetőségét. Mindezek alapján **javaslom** a nyilvános vita **kitűzését** és Kubinyi Enikő akadémiai doktori művének **elfogadását**.

Debrecen, 2020. október 5.



Barta Zoltán