



Warszawa, 31.01.2022

### Recenzja rozprawy doktorskiej

**Lek. Marcina Kolbuca pt. „Zaburzenia homeostazy magnezu i kwasu moczowego u dzieci z wadami nerek i układu moczowego na podłożu mutacji genu *HNF1B*”**

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki z dnia 24.11.2021 r.

#### Wstęp

Hepatocytowy czynnik jądrowy 1 $\beta$  (*HNF1B*) to czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów związanych z organogenezą układu moczowego, narządów płciowych, ale także narządów trzewnych, płuc i przytarczyc. Uważa się, że mutacje genu *HNF1B* stanowią najczęstszą monogenową przyczynę wad układu moczowego. Warto przy tym podkreślić szerokie spektrum manifestacji ze strony układu moczowego takich jak zmiany torbielowate w nerkach, wady dróg moczowych, dysplazje nerek lub nerkę podkowiastą. Wadom układu moczowego towarzyszyć mogą zróżnicowane objawy ze strony innych układów: zaburzenia neurologiczne, wady wątroby i dróg żółciowych lub trzustki w tym cukrzyca *MODY5*. Unikalną cechą manifestacji nerkowych u chorych z mutacjami *HNF1B* jest skłonność do hiperurykemii i hipomagnezemii, przy czym światowa literatura nie definiuje w sposób pewny i jednoznaczny ani kryteriów, ani częstości występowania tych zaburzeń. Wiarygodne wytypowanie, którzy pacjenci z wadami układu moczowego, mogą być nosicielami mutacji genu *HNF1B* ma ogromne znaczenie kliniczne, ponieważ chorzy ci wymagają badań diagnostycznych innych układów oraz wielospecjalistycznej opieki. Należy tu podkreślić, że pacjenci z mutacją *HNF1B* cechują się zwiększonym ryzykiem rozwoju dny moczanowej, cukrzycy typu *MODY* i cukrzycy po przeszczepieniu nerki.

Doktorant podjął się niezwykle ważnego zagadnienia dokładnej oceny homeostazy kwasu moczowego i magnezu u tych chorych. Podjął się także próby odpowiedzi na pytanie, czy oceniając te proste parametry biochemiczne możemy wytypować w grupie pacjentów z

wadami układu moczowego chorych, u których należy wykonać badania w kierunku mutacji genu *HNF1B*.

### **Ocena formalna**

Przedstawiona do oceny rozprawa obejmuje: 37-stronnicowe opracowanie w języku polskim dotyczące oceny częstości zaburzeń homeostazy magnezu i kwasu moczowego u dzieci z mutacją genu *HNF1B*, którego uzupełnienie stanowią 34 pozycje piśmiennictwa i oświadczenie współautorów prac oraz 3 wydrukowane w czasopismach anglojęzycznych prace: 2 prace oryginalne: „Hypomagnesemia is underestimated in children with HNF1B mutations” autorów Marcin Kołbuc, Lennart Leßmeier, Dorota Salamon-Słowińska, Ilona Małecka, Krzysztof Pawlaczyk, Jarosław Walkowiak, Jacek Wysocki, Bodo B Beck i Marcin Zaniew opublikowana w *Pediatric Nephrology* 2020; 35(10): 1877-1886 (IF 3,714, 140 pkt MEiN) i „Hyperuricemia is an early and relatively common feature in children with HNF1B nephropathy but its utility as a predictor of the disease is limited” autorów: Marcin Kołbuc, Beata Bieniaś, Sandra Habbig, Mateusz F. Kołek, Maria Szczepańska, Katarzyna Kiliś-Pstrusińska, Anna Wasilewska, Piotr Adamczyk, Rafał Motyka, Marcin Tkaczyk, Przemysław Sikora, Bodo B. Beck i Marcin Zaniew opublikowana w czasopiśmie *Journal of Clinical Medicine* 2021; 10(24): 3265 (IF 4,242, 140 pkt MEiN) oraz opis 4 przypadków „Four Cases of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) Type 5 Associated with Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor 1 Beta (HNF1B) Gene Presenting in a 13-Year-Old Boy and in Adult Men Aged 33, 34, and 35 Years in Poland” autorów: Rafał Motyka, Marcin Kołbuc, Wojciech Wierzchołowski, Bodo B. Beck, Iwona Ewa Towpik, Marcin Zaniew opublikowany w *American Journal of Case Reports* 2021; 22: e928994 (IF 0,736, 70 pkt MEiN). Łączny Impact Factor przedstawionych prac wynosi 8,692, punktacja MEiN – 350 pkt.

Załączone do pracy doktorskiej oświadczenia współautorów publikacji w sposób jednoznaczny i niebudzący wątpliwości wskazują na samodzielną pracę Doktoranta w zakresie powstania rozprawy.

### **Ocena szczegółowa**

**Wstęp** zawiera wyczerpujące informacje dotyczące patofizjologii i manifestacji klinicznych mutacji genu *HNF1B* ze szczególnym uwzględnieniem manifestacji nerkowych. W kolejnych częściach wstępu Doktorant podkreśla potrzebę opracowania narzędzia diagnostycznego mającego wspomóc lekarzy klinicystów w wytypowaniu chorych, u których

należy wykonać badania genetyczne w kierunku mutacji *HNF1B*. Na uwagę zasługuje niezwykle jasno przedstawione podsumowanie aktualnej wiedzy na temat patofizjologii tych zaburzeń oraz szczegółowa analiza dotychczasowych danych epidemiologicznych występowania hipomagnezemii i hiperurykemii u chorych mutacją *HNF1B*. Analiza ta uzupełniona jest o 2 tabele. Doktorant niezwykle trafnie zauważa, że dotychczasowe opracowania dotyczyły małych grup pacjentów i stosowano różne kryteria biochemiczne. Całość wstępu pokazuje głęboką wiedzę teoretyczną Doktoranta na temat podejmowanego zagadnienia.

**Cele pracy** zostały jasno i precyzyjnie sformułowane. O wnikliwości i dojrzałym warsztacie naukowym Doktoranta świadczy znakomicie sformułowany pierwszy cel: ocena częstości występowania zaburzeń homeostazy magnezu i kwasu moczowego u dzieci z mutacją genu *HNF1B* w oparciu o najnowsze pediatryczne wartości referencyjne dla stężenia magnezu i kwasu moczowego w surowicy. Dzięki zastosowaniu takich kryteriów wiarygodność otrzymanych wyników jest znacząco wyższa. Kolejne cele to: ocena związku przyczynowego pomiędzy hiperurykemią i mutacją genu *HNF1B* oraz ocena przydatności klinicznej hipomagnezemii i hiperurykemii jako predyktorów nefropatii HNF1B.

Kolejny rozdział stanowi podsumowanie wyników uzyskanych przez Doktoranta opublikowanych w 2 pracach oryginalnych i opisie 4 przypadków.

### **Praca 1: Hypomagnesemia is underestimated in children with HNF1B mutations.**

W pracy przedstawiono retrospektywną analizę 14 pacjentów z potwierdzoną mutacją w genie *HNF1B*. Celem była ocena częstości występowania hipomagnezemii w tej grupie pacjentów. Na szczególną pochwałę zasługuje opracowanie przez Doktoranta, dla potrzeb pracy, lokalnych norm stężenia magnezu w surowicy w oparciu o wyniki uzyskane u 110 zdrowych dzieci. Uwzględniając lokalne normy częstość hipomagnezemii u dzieci z mutacją *HNF1B* wzrosła z ok. 20% do ok. 80%. Kolejną niezwykle istotną obserwacją jest przydatność zastosowania frakcjonowanego wydalania magnezu (FeMg%) do oceny gospodarki magnezowej w tej grupie chorych. Praca jest napisana doskonałym językiem angielskim, ma znakomity wstęp, bardzo jasno przedstawione metody oraz wyniki. Doktorant dyskutuje swoje wyniki z dostępną w światowej literaturze wiedzą. Dobór piśmiennictwa oceniam jako wzorcowy. W pracy Doktorant wykazał się głęboką wiedzą na temat homeostazy magnezu nie tylko w omawianej patologii, ale i innych chorobach nerek takich jak genetycznie uwarunkowane tubulopatie. Zarzutem wobec pracy może być mała liczba przebadanych dzieci oraz zrekrutowanie grupy kontrolnej spośród pacjentów poradni

nefrologicznej, ale Doktorant zauważa te ograniczenia i umiejętnie omawia je w dyskusji. Potwierdzeniem wartości uzyskanych wyników jest publikacja pracy w najbardziej prestiżowym czasopiśmie dedykowanym chorobom nerek u dzieci – *Pediatric Nephrology*.

### **Praca 2: Four Cases of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) Type 5 Associated with Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor 1 Beta (HNF1B) Gene Presenting in a 13-Year-Old Boy and in Adult Men Aged 33, 34, and 35 Years in Poland**

Praca stanowi wnikliwy opis 4 przypadków chorych z cukrzycą MODY i mutacją *HNF1B*. Na podstawie 4 przypadków Doktorant przedstawił praktyczne aspekty diagnostyki klinicznej, biochemicznej i molekularnej w tej grupie chorych. Na szczególną uwagę zasługuje dokładna analiza gospodarki magnezowej u pacjentów i podkreślenie wagi oceny tej gospodarki (w tym frakcjonowanego wydalania magnezu) u chorych z współistniejącą cukrzycą i wadami układu moczowego. Praca ma ogromną wartość praktyczną i stanowi cenne źródło wiedzy dla lekarzy klinicystów zarówno nefrologów, diabetologów jak i endokrynologów zajmujących się dziećmi i dorosłymi. Praca została napisana w sposób jasny, zwięzły i zrozumiały. Wnikliwie przeanalizowano każdy przypadek a uzyskane wnioski zostały należycie uzasadnione. Na szczególną uwagę zasługuje dyskusja, w której szczegółowo omówiono patofizjologię i klinikę problemów nefrologicznych i diabetologicznych u chorych z mutacjami *HNF1B*. Praca została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie amerykańskim dedykowanym opisom przypadków – *American Journal of Case Reports*.

### **Praca 3: Hyperuricemia Is an Early and Relatively Common Feature in Children with HNF1B Nephropathy but Its Utility as a Predictor of the Disease Is Limited**

W pracy poddano analizie dane 108 pacjentów obserwowanych w kierunku mutacji *HNF1B*. W grupie tej było 43 pacjentów z potwierdzoną mutacją i 65 pacjentów z wykluczonym defektem genetycznym. Obie grupy porównano pod kątem licznych parametrów klinicznych i biochemicznych w tym stężenia kwasu moczowego i magnezu w surowicy i moczu. W pracy Doktorant wykazał, że podwyższenie stężenia kwasu moczowego w surowicy występuje 3-krotnie częściej u chorych z mutacją *HNF1B* w porównaniu do grupy kontrolnej, co podkreśla zasadność oceny stężenia kwasu moczowego u chorych z wadami układu moczowego. O niezwyklej wartości i nowatorstwie pracy Doktoranta stanowią jednak dodatkowe wnioski. Po pierwsze Doktorant wykazał, że pomimo wyższego stężenia kwasu moczowego w surowicy grupy nie różnią się frakcjonowanym wydalaniem kwasu

moczowego. Po drugie analiza wieloczynnikowa uzyskanych wyników pozwoliła na wykazanie, że najsilniejszymi predyktorami występowania mutacji *HNF1B* jest hipomagnezemia i podwyższone stężenie parathormonu, a dodanie hiperurykემii do modelu nie poprawia jego wartości predykcyjnej. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie nowatorskiego a zarazem niezwykle praktycznego wniosku, że hiperurykemia, pomimo że częsta, nie może być uznana za marker nefropatii HNF1B w przeciwieństwie do hipomagnezemii i nadczynności przytarczyc. Praca jest napisana doskonałym językiem, wstęp świetnie podsumowuje dotychczasową wiedzę na temat hiperurykემii w tej grupie chorych, dobór i wielkość grupy badanej zasługuje na wielką pochwałę, a metody w tym metody statystyczne zostały dobrane odpowiednio. Wyniki przedstawione są w sposób jasny i klarowny. W dyskusji Doktorant omawia swoje wyniki i świetnie analizuje je w oparciu o dostępną literaturę. O wartości pracy stanowi fakt jej publikacji w wysoko punktowanym czasopiśmie a także zakwalifikowanie jej do prezentacji w formie ustnej na 53. Konferencji Naukowej Europejskiego Towarzystwa Nefrologii Dziecięcej w Amsterdamie w roku 2021.

W podsumowaniu przedstawionych 3 prac należy stwierdzić, że Doktorant zastosował odpowiednie metody badawcze do zrealizowania założonego celu. Na podkreślenie zasługuje dobór grupy badawczej i opracowanie własnych lokalnych norm stężenia magnezu w surowicy. Wykorzystane metody statystyczne zostały dokładnie opisane i są odpowiednie do analizy materiału. Należy podkreślić sprawne posługiwanie się przez Doktoranta analizą wieloczynnikową w pracy nr 3.

Wszystkie wyniki zostały przedstawione w jasny i klarowny sposób. Tabele i ryciny w pracach są czytelne, nie powtarzają informacji z tekstu, stanowią natomiast cenne uzupełnienie wyników.

Dyskusja we wszystkich trzech publikacjach poprowadzona jest w sposób wzorowy. Doktorant w prawidłowy sposób odnosi swoje wyniki do wyników innych autorów. Tam, gdzie wykazano istotne różnice, stawia trafne hipotezy wyjaśniające rozbieżności. Na uwagę zasługuje jasne i rzetelne przedstawienie ograniczeń wykonanych badań w dyskusjach obu prac oryginalnych. Dokładne omówienie ograniczeń pokazuje szeroką wiedzę Doktoranta i po raz kolejny wskazuje na Jego dojrzałość naukową.

W przedstawionej pracy doktorskiej Doktorant zacytował 34 pozycje piśmiennictwa. Dodatkowo w publikacjach stanowiących podstawę pracy doktorskiej zacytowano odpowiednio: 27, 23 i 35 pozycji piśmiennictwa. Dobór piśmiennictwa oceniam jako wzorowy, zdecydowana większość zacytowanych pozycji była publikowana w ostatnich 10

latach. Doktorant zacytował wszystkie najważniejsze pozycje piśmiennictwa z omawianego zagadnienia zarówno z zakresu badań podstawowych jak i analiz klinicznych.

## **Wnioski**

Zwieńczeniem pracy jest 5 wniosków logicznie wypływających z przeprowadzonej w 3 publikacjach analizy:

1. Hipomagnezemia i hiperurykemia u dzieci z nefropatią *HNF1B* są niedoszacowane, co wydaje się mieć częściowo związek ze stosowanymi przez autorów większości prac niewłaściwych wartości referencyjnych dla stężenia magnezu i kwasu moczowego w surowicy
2. Hipomagnezemia jest najczęstszym zaburzeniem biochemicznym u dzieci z CAKUT na podłożu mutacji *HNF1B* i jest jej silnym predyktorem
3. Hiperurykemia jest wcześnie występującym oraz relatywnie częstym zaburzeniem występującym u dzieci z nefropatią *HNF1B* i przyczynowo związanym z mutacją tego genu. Jednakże jej przydatność kliniczna w przewidywaniu mutacji genu *HNF1B* jest ograniczona.
4. Czynność nerek, frakcjonowane wydalanie kwasu moczowego oraz stężenie PTH mają największy wpływ na stężenie kwasu moczowego u dzieci z CAKUT.
5. Ocena frakcjonowanego wydalania kwasu moczowego nie ma żadnej wartości w selekcji dzieci z CAKUT do diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji *HNF1B*. Dalszych badań wymaga określenie przydatności oceny PTH w prognozowaniu nefropatii na podłożu mutacji tego genu.

## **Wartość praktyczna pracy**

Uzyskane wyniki i sformułowane na ich podstawie wnioski stanowią niezwykłą wartość praktyczną. Wady wrodzone nerek i układu moczowego określane akronimem CAKUT (congenital anomalies of kidney and urinary tract) stanowią najczęstsze, obok wad układu krążenia, wrodzone nieprawidłowości wykrywane u dzieci. U większości pacjentów z CAKUT nie udaje się zidentyfikować podłoża genetycznego, nie ma też konieczności przeprowadzania badań genetycznych, ponieważ nie zmienia to postępowania z chorym. Inaczej jest w przypadku nosicieli mutacji *HNF1B* – wykrycie takiej mutacji nakazuje przeprowadzenie badań diagnostycznych w kierunku nieprawidłowości innych układów w tym układu rozrodczego oraz objęcie chorego opieką wielospecjalistyczną. Stąd opracowanie algorytmu, którzy pacjenci z CAKUT powinni być poddani badaniu genetycznemu, ma niezwykle znaczenie praktyczne. Opracowany i opublikowany przez Faguera i wsp. w roku

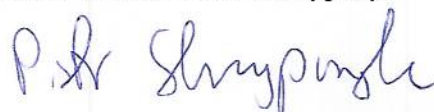
2014 tzw. „HNF1B score” nie uwzględnia specyfiki pediatrycznej, stąd nie jest dobrym narzędziem szczególnie u najmłodszych pacjentów. W oparciu o swoje wyniki Doktorant proponuje ocenę gospodarki magnezowej (stężenie magnezu w surowicy i frakcjonowane wydalanie magnezu) jako tanie i powszechnie dostępne narzędzie pozwalające wytypować kandydatów do badania genetycznego. Jest to wielka wartość pracy Doktoranta, która powinna zmienić praktykę kliniczną a być może także rekomendacje towarzystw naukowych dotyczące postępowania z dziećmi z CAKUT.

### **Podsumowanie**

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. 2018 poz. 1668). Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Postawienie celów, zaplanowanie badań, wykonanie pracy, z której wyciągnięto istotne wnioski, świadczą o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktoranta oraz jednoznacznie demonstrowują umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta. Doktorant wykazał się przy tym ogromną wiedzą teoretyczną w dziedzinie nefrologii dziecięcej a w szczególności w zakresie fizjologii i patofizjologii cewki nerkowej. Szczególną uwagę zwracają szczegółowa analiza gospodarki magnezowej w tej grupie chorych oraz wytypowanie kryteriów biochemicznych, które mogłyby posłużyć do wyselekcjonowania pacjentów, u których należy wykonać badania molekularne. Praca Doktoranta stanowi niezwykle udany przykład przełożenia badań naukowych na praktykę kliniczną.

Mając na uwadze powyższe przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o dopuszczenie lek. Marcina Kołbuca do dalszych etapów przewodu doktorskiego a ze względu na szczególne walory pracy i jej nowatorski i pionierski a zarazem niezwykle praktyczny charakter wnoszę o jej wyróżnienie.

dr hab. n. med. Piotr Skrzypczyk



Katedra i Klinika Pediatrii i Nefrologii  
Warszawski Uniwersytet Medyczny