



Analysis of relationship between UMOD polymorphisms rs13335818, rs4293393 and rs13333226 and risk of chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis

Analiza związku polimorfizmów rs13335818, rs4293393 i rs13333226 genu UMOD z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek

Joanna Żywiec¹, Grzegorz Piecha², Mateusz Gola³, Katarzyna Kiliś-Pstrusińska⁴, Andrzej Więcek²,
Janusz Gumprecht¹, Władysław Grzeszczak¹

¹Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

³Niepubliczny Zakład Opieki Zdrowotnej Rodzinna Służba Zdrowia "Gmin-Med" Sp. z o.o. w Dobieszowicach

⁴Katedra Nefrologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic glomerulonephritis is one of the common causes of chronic kidney disease that can lead to end-stage renal failure and the need for renal replacement therapy. Understanding the aetiology of this disease and its risk factors can help develop new methods of early diagnosis and effective therapy. Uromodulin is a protein with a broad spectrum of activity, and is involved in the key pathways that regulate kidney homeostasis.

AIM OF THE STUDY: The aim of the study was to analyse the relationship between three selected polymorphisms (rs13335818, rs4293393 and rs13333226) of the uromodulin gene (UMOD) and the risk of chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis.

MATERIAL AND METHODS: 113 patients with chronic glomerulonephritis and eGFR < 60 ml/min/1.73 m² (experimental group) and 196 patients from the General Outpatient Clinic without a history of renal disease and eGFR > 60 ml/min/1.73 m² (control group) were recruited for the study. The study protocol assumed a one-time blood collection for genetic testing and serum creatinine level determination. Genetic material was isolated from the peripheral blood lymphocytes of the subjects. Genotyping of the analysed polymorphisms was performed using TaqMan SNP Genotyping Assay kits. The results were processed with statistical methods using Statistica 10 and Microsoft Office Excel 2003 software, the Mann-Whitney U test and the χ^2 test. Statistical significance was adopted at $p < 0.05$.

Received: 10.09.2016

Revised: 27.09.2016

Accepted: 28.10.2016

Published online: 09.06.2017

Address for correspondence: Dr hab. n. med. Joanna Żywiec, Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze, tel. +48 32 370 44 26, e-mail: jzywiec@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl



RESULTS: No statistically significant differences in the distribution of genotypes between the experimental and control groups were found for any of the three analysed UMOD variants.

CONCLUSIONS: UMOD polymorphisms rs13335818, rs4293393 and rs13333226 are not associated with the risk of chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis.

KEY WORDS

chronic kidney disease, chronic glomerulonephritis, uromodulin gene polymorphisms

STRESZCZENIE

WSTĘP: Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek jest jedną z częstych przyczyn przewlekłej choroby nerek mogącej prowadzić do ich schyłkowej niewydolności i konieczności stosowania terapii nerkozastępczej. Poznanie etiologii tej choroby oraz czynników ryzyka daje nadzieję na wdrożenie nowych metod wczesnej diagnostyki i skutecznej terapii. Uromodulina jest białkiem prezentującym szerokie spektrum działań, włączonym w kluczowe szlaki warunkujące homeostazę nerek.

CEL PRACY: Celem pracy była ocena związku wybranych trzech polimorfizmów (rs13335818, rs4293393 i rs13333226) genu uromoduliny (UMOD) z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek.

MATERIAŁ I METODY: Do badania zrekrutowano 113 chorych z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek i eGFR < 60 ml/min/1,73 m² (grupa badana) oraz 196 pacjentów Poradni Ogólnej POZ bez chorób układu moczowego w wywiadzie, z eGFR > 60 ml/min/1,73 m² (grupa kontrolna). Protokół badania przewidywał jednorazowe pobranie krwi do wykonania badań genetycznych oraz w celu oznaczenia stężenia kreatyniny w surowicy. Materiał genetyczny wyizolowano z limfocytów krwi obwodowej badanych. Genotypowanie badanych polimorfizmów przeprowadzono z wykorzystaniem zestawów TaqMan SNP Genotyping Assay.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie na podstawie programów Statistica 10 i Microsoft Office Excel 2003 z wykorzystaniem: testu Manna-Whitneya i testu χ^2 . Za granice istotności statystycznej przyjęto wartości $p < 0,05$.

WYNIKI: W zakresie żadnego z trzech badanych polimorfizmów UMOD nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupami badaną a kontrolną.

WNIOSKI: Nie wykazano związku polimorfizmów rs13335818, rs4293393 i rs13333226 genu UMOD z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek.

SŁOWA KLUCZOWE

przewlekła choroba nerek, przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek, polimorfizmy genu uromoduliny

INTRODUCTION

Research on uromodulin has been carried out for over 65 years, but the role of this protein produced by renal tubular cells and excreted in the urine remains unclear, yet important beyond any question [1,2,3,4,5]. Many facts suggest that uromodulin is a key substance regulating homeostasis of the urinary system [6,7]. It determines the normal development of nephrons, regulates transport through ion channels (NKCC2, ROMK2) [8,9,10,11], but its major function is cytoprotection, generally defined as the multidirectional protection of the urinary system against all potentially pathogenic factors [6]. Because of the specific structure of the protein chain and its gel-like form, uromodulin acts locally in the urinary tract like a mechanical trap for microorganisms, elements of the immune system, etc. [12,13,14,15,16]. It also has an immune-

WSTĘP

Historia badań nad uromoduliną liczy ponad 65 lat, ale rola tego białka produkowanego przez komórki cewek nerkowych i wydalanego do moczu nadal pozostaje niejasna, choć niepodważalnie istotna [1,2,3,4,5]. Wiele faktów przemawia za tym, że uromodulina jest kluczowym elementem warunkującym zachowanie homeostazy układu moczowego [6,7]. Nie tylko determinuje prawidłowy rozwój nefronów czy reguluje transport jonów m.in. przez wpływ na kanały jonowe (NKCC2, ROMK2) [8,9,10,11], lecz jej główną rolę wydaje się cytoprotekcja, szeroko rozumiana jako wielokierunkowa ochrona układu moczowego przed wszelkimi potencjalnie patologicznymi czynnikami [6]. Dzięki specyficznej budowie łańcucha białkowego i żelowej strukturze rozwija swoje działanie lokalnie w drogach moczowych, wiążąc jak mechaniczna



lating effect on the systemic inflammatory process [18,19,20].

A breakthrough in research on uromodulin occurred in 2009 when Anna Kottgen et al. published findings from the genome-wide association study (GWAS), indicating the uromodulin gene as a potential locus determining glomerular filtration rate and its correlation with chronic kidney disease [20]. Further research by Kottgen et al., designed as a case-control study in a group of 200 patients with chronic kidney disease (CKD), revealed that higher urinary excretion of uromodulin was a predictor of deteriorated renal function and was associated with the UMOD rs4293393 polymorphism [21]. In 2010, a group of Glasgow researchers analysed the genome in 1621 hypertensive patients and demonstrated that the G allele (UMOD; rs13333226) is associated with a lower risk of hypertension, reduced urinary uromodulin excretion, and better renal function [22]. A study published in 2010 carried out by Gudbjartsson et al. in an Icelandic population (3,203 cases of chronic kidney disease and 38,782 healthy controls) revealed a significantly higher frequency (89%) of the T allele in the UMOD rs4293393 polymorphism in subjects with CKD. The correlation between the investigated UMOD gene polymorphism and the occurrence of chronic kidney disease and serum creatinine was stronger in older patients. The UMOD gene variant also conferred protection against kidney stones when studied in 3,617 Icelandic kidney stone cases and 43,201 controls [23]. In 2010 Swedish researchers Möllsten and Torffvit designed a study to analyse the association of uromodulin with distal tubular dysfunction in patients with diabetes mellitus. The analysis of urine collected from 301 patients with type 1 diabetes (91 with microalbuminuria and 46 with macroalbuminuria) showed tubular dysfunction in patients with macroalbuminuria (70% of patients), and it was associated with the AA and AT genotypes of rs12444268 in the UMOD gene [24]. Anna Reznichenko and her research team demonstrated the association of the rs12917707 minor allele frequency (MAF) of uromodulin with a lower risk of end-stage renal disease in renal transplant recipients, regardless of their age, sex or underlying aetiology of ESRD [25]. Böger et al. followed about 26,000 individuals for over 7 years and revealed the association of the T allele at rs12917707 with a reduced risk of kidney injury [26]. The association of selected uromodulin gene variants with renal function was also confirmed by other authors [27,28].

Numerous findings suggest that uromodulin is a very important link in the pathophysiology of kidney disease. Indeed, the results of many studies are slowly beginning to add new elements to the complex pathophysiological network of pathways linking physiological disorders related to uromodulin with the risk of developing severe renal disease and its progression

pułapka m.in. drobnoustroje i elementy układu immunologicznego [12,13,14,15,16]. Wpływa ponadto modyfikująco na ogólnoustrojowy proces zapalny, wykazując właściwości immunomodulatora [18,19,20].

Przełom zainteresowań uromoduliną nastąpił w roku 2009, kiedy Anna Kottgen i wsp. opublikowali wyniki badania GWAS (*Genome-wide association study*), wskazujące na gen uromoduliny jako potencjalne *locus* warunkujące filtrację kłębuszkową i korelujące z przewlekłą chorobą nerek [20]. W dalszych badaniach Kottgen i wsp., prowadzonych jako badanie kliniczno-kontrolne w grupie 200 chorych z przewlekłą chorobą nerek (PChN), zaobserwowano, że wydalanie z moczem większych ilości uromoduliny było objawem wyprzedzającym pogorszenie funkcji nerek i wykazywało związek z polimorfizmem rs4293393 genu UMOD [21]. W roku 2010 grupa naukowców z Glasgow, drogą analizy genomu dokonanej u 1621 chorych na nadciśnienie tętnicze, wykazała m.in., że allele G polimorfizmu rs13333226 genu UMOD wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem występowania nadciśnienia tętniczego, mniejszym wydalaniem uromoduliny z moczem i lepszą funkcją nerek [22]. Opublikowane w 2010 r. przez Gudbjartssona i wsp. wyniki badań prowadzonych w populacji islandzkiej (3 203 chorych z przewlekłą chorobą nerek i 38 782 osoby zdrowe w grupie kontrolnej) dowiodły znamienne częstszego (89%) występowania allelu T polimorfizmu rs4293393 genu UMOD u osób z PChN. Korelacja pomiędzy badanym polimorfizmem genu UMOD a występowaniem przewlekłej choroby nerek i stężeniem kreatyniny w surowicy była wyraźniejsza w grupie chorych starszych. Badany wariant genu UMOD był równocześnie czynnikiem chroniącym przed tworzeniem złogów w nerkach, co wykazano porównując w tym samym badaniu 3 617 chorych z kamicią nerkową i 43 201 osób z grupy kontrolnej [23]. Autorzy szwedzcy, Möllsten i Torffvit, w 2010 r. zaplanowali badanie mające na celu ustalenie związku uromoduliny z dysfunkcją cewek dalszych u chorych z cukrzycą. Analizując wyniki 301 chorych z cukrzycą typu 1 (w tym 91 osób z mikroalbuminurią i 46 z białkomoczem), stwierdzili oni dysfunkcję cewki dalszej u 70% chorych z białkomoczem, co łączyło się z występowaniem genotypów AA i AT polimorfizmu rs12444268 genu UMOD [24]. Anna Reznichenko wraz z zespołem wykazała związek MAF (*minor allele frequency*) polimorfizmu rs12917707 genu uromoduliny z mniejszym ryzykiem rozwoju schyłkowej niewydolności nerek w grupie biorców nerki, niezależnie od wieku chorych, płci czy etiologii uszkodzenia nerek [25]. Böger i wsp., obserwując przez ponad 7 lat grupę około 26 tysięcy osób, ujawnili związek allelu T polimorfizmu rs12917707 z redukcją ryzyka wystąpienia uszkodzenia nerek [26]. Również inni autorzy potwierdzili asocjacje wybranych polimorfizmów genu uromoduliny z funkcją nerek [27,28].



towards end-stage renal failure [5,23,25,26,29,30]. In recent decades chronic kidney disease has become a social problem, as it now affects about 11% of the population in developing countries [31]. Despite significant advances in diagnostics, therapy and medical technology, we have reached a point where medicine is unable to offer to a large group of people with end-stage renal disease caused by various diseases any alternative to renal replacement therapy, which unfortunately does not provide full quality of life. Considering this fact, great hope is put in studies aimed at setting new trends for the early diagnosis and effective treatment of kidney disease [28,32]. Research on the role of uromodulin in the physiology and pathogenesis certainly represents one of these trends.

The aim of this study was to analyse the relationship between three selected polymorphisms (rs13335818, rs4293393 and rs13333226) of the uromodulin gene (UMOD) and the risk of chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis.

MATERIAL AND METHODS

Recruitment to the experimental group was carried out at the Outpatient Nephrology Clinic, Nephrology Department and Dialysis Centre among patients with chronic glomerulonephritis and the third or higher stage of chronic kidney disease, i.e. estimated glomerular filtration rate < 60 ml/min/1.73 m². Other causes of chronic kidney disease were ruled out based on interviews and available medical records. The control group comprised consecutive patients without a history of urinary tract disease who were referred for a visit to the Primary Care Outpatient Clinic.

All the subjects were Caucasians and gave written informed consent to participate in the study. Informed consent on behalf of children under the age of 18 was given by parents or legal guardians. The study was approved by the Bioethics Committee of the Silesian Medical University in Katowice, Poland.

The study protocol assumed a one-time visit of the patient, during which a venous blood sample was collected for laboratory testing (for planned genetic analyses and serum creatinine determination), a retrospective analysis of medical records, and anthropometric measurements (body weight and height). Patients undergoing renal replacement therapy with repetitive haemodialysis were examined on the day of the scheduled dialysis, and blood was sampled prior to treatment. Information on the diagnosis, the course of the primary disease, and the coexistence of hypertension was acquired from the available medical records. Chronic glomerulonephritis was diagnosed based on the histopathological examination of a kidney biopsy

Liczne przesłanki sugerują, że uromodulina jest bardzo ważnym ogniwem w patofizjologii chorób nerek. W istocie wyniki wielu badań zaczynają powoli dopełniać obraz skomplikowanej sieci połączeń patofizjologicznych, prowadzących od zaburzeń fizjologicznego działania uromoduliny do rozwoju poważnych chorób nerek i ich progresji w kierunku schyłkowej niewydolności [5,23,25,26,29,30].

Temat przewlekłej choroby nerek od kilku dekad urasta do rangi problemu społecznego, bowiem dotyczy około 11% populacji krajów rozwiniętych [31]. Mimo znaczącego postępu diagnostyki, terapii, techniki i technologii medycznych doszliśmy do granicy, kiedy licznej grupie osób ze schyłkową niewydolnością nerek na tle różnych chorób nie jesteśmy w stanie zaoferować niczego poza terapią nerkozastępczą, niezapewniającą niestety pełnego komfortu życia. W tej sytuacji wielką nadzieję budzą wszelkie wyniki badań wskazujące nowe kierunki wczesnej diagnostyki i skutecznego leczenia chorób nerek [28,32]. Jeden z takich kierunków wyznaczają niewątpliwie badania nad rolą fizjologiczną i patogenetyczną uromoduliny.

Celem pracy była ocena związku wybranych trzech polimorfizmów (rs13335818, rs4293393 i rs13333226) genu uromoduliny (UMOD) z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek.

MATERIAŁ I METODY

Rekrutacja do grupy badanej została przeprowadzona w Poradni Nefrologicznej, Oddziale Nefrologii i Stacji Dializ wśród osób z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek w co najmniej trzecim stadium przewlekłej choroby nerek, tj. szacowaną filtracją kłębuszkową mniejszą niż 60 ml/min/1,73 m². Na podstawie wywiadu oraz dostępnej dokumentacji medycznej wykluczono inne przyczyny przewlekłej choroby nerek. Grupę kontrolną stanowili kolejni pacjenci bez chorób układu moczowego w wywiadzie, zgłaszający się na wizytę do Poradni Podstawowej Opieki Zdrowotnej.

Wszyscy badani byli przedstawicielami rasy kaukaskiej. Wyrazili pisemnie świadomą zgodę na udział w badaniu. W imieniu dzieci w wieku poniżej 18 lat zgodę wyrazili również rodzice (prawni opiekunowie). Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Protokół badania przewidywał jednorazową wizytę pacjenta, w czasie której pobrano próbkę krwi żyłnej do badań laboratoryjnych (celem przeprowadzenia zaplanowanych badań genetycznych oraz oznaczenia



or a typical clinical presentation (proteinuria and/or erythrocyturia) after ruling out other causes for these symptoms and types of renal disease based on additional tests. Hypertension was diagnosed in adults according to the criteria of the European Society of Hypertension, published in 2009, and in minors based on the 4th Report of the Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents published in 2004 [33,34]. The estimated glomerular filtration rate was calculated using levels of serum creatinine and the Modification of Diet in Renal Diseases Study Equation (MDRD) for adults, or the Schwartz equation for patients aged under 18. [35,36].

All genetic tests were performed at the Laboratory of the Chair of Internal Medicine, Diabetology and Nephrology in Zabrze.

Genetic material was isolated from peripheral blood lymphocytes of the subjects. Genotyping of the polymorphisms was performed using fluorescence-labelled probes and TaqMan SNP Genotyping Assay kits. The results were processed with statistical methods using Statistica 10 and Microsoft Office Excel 2003 software. All quantitative data were expressed as means \pm standard deviation, and qualitative data as absolute and relative values (i.e. percentage of the total value). Differences between the groups in quantitative data that did not meet the criteria for normal distribution were analysed using the Mann-Whitney U test. The χ^2 test was used to compare differences between the qualitative variables in the two groups. In all the statistical analyses the level of statistical significance was adopted at $p < 0.05$.

RESULTS

The study encompassed a total of 309 subjects. The group of patients with chronic glomerulonephritis and CKD at stage 3 or higher comprised 113 patients, of which 41 (36.3%) were women and 72 (63.7%) were men. The mean age of the patients was 35.2 ± 16.2 years. In 55 (48.7%) patients the diagnosis of CGN was confirmed by histopathological examination of a renal biopsy. At the time of the study the mean eGFR in patients was 28.4 ± 25.3 ml/min/1.73 m². Of all the patients 13% were on conservative treatment, 48% were on dialysis, and 39% had had a renal transplant. 102 (90.3%) patients had a history of co-existing CKD and hypertension.

After excluding subjects with eGFR < 60 ml/min/1.73 m², 196 subjects qualified to the control group: 92 (46.9%) women and 104 (53.1%) men of mean age 48.6 ± 17.2 years. Within this group hypertension was diagnosed in 77 (39.3%) patients. Compared to subjects without a history of hypertension, these patients were significantly older (60.5 ± 12.0 vs. 40.1 ± 15.7

stężenia kreatyniny w surowicy), a także retrospektywną analizę dokumentacji medycznej i wykonanie pomiarów antropometrycznych (masa ciała, wzrost). Chorych leczonych nerkozastępczo metodą powtarzanych hemodializ badano w dniu planowej dializy, a krew pobierano przed rozpoczęciem zabiegu. Na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej uzyskano dane dotyczące rozpoznania i przebiegu choroby podstawowej oraz współistnienia nadciśnienia tętniczego. Podstawę rozpoznania przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek stanowił wynik badania histopatologicznego bioptatu nerki lub typowy obraz kliniczny (białkomocz lub/i erythrocyturia) po wykluczeniu na podstawie wykonanych badań dodatkowych innych przyczyn ww. objawów i innych chorób nerek. Nadciśnienie tętnicze zostało rozpoznane według kryteriów Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego z 2009 r. lub, w przypadku osób niepełnoletnich, na podstawie IV Raportu Grupy Roboczej do spraw Kontroli Nadciśnienia Tętniczego u Dzieci i Młodzieży z 2004 r. [33,34]. Opierając się na wyniku stężenia kreatyniny w surowicy, obliczono szacowaną filtrację kłębuszkową według wzoru MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases Study Equation) dla osób dorosłych i wzoru Schwartza dla chorych poniżej 18 r.ż. [35,36].

Wszystkie badania genetyczne wykonano w Laboratorium Katedry Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii w Zabrzu.

Materiał genetyczny wyizolowano z limfocytów krwi obwodowej badanych. Genotypowanie badanych polimorfizmów przeprowadzono za pomocą znakowanych fluorescencyjnie sond z wykorzystaniem zestawów TaqMan SNP Genotyping Assay. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, korzystając z programu Statistica 10 i Microsoft Office Excel 2003. Wszystkie dane ilościowe przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe, zaś dane jakościowe jako wartości bezwzględna oraz względna (tj. procent całości). W przypadku danych ilościowych niespełniających kryterium rozkładu normalnego dla oceny różnic międzygrupowych wykorzystano test U Manna-Whitneya. Testem χ^2 posłużono się, porównując różnice międzygrupowe w zakresie zmiennych jakościowych. We wszystkich analizach statystycznych przyjęto za granicę istotności poziom prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

WYNIKI

Badaniami objęto w sumie 309 osób. Grupa chorych z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek w stadium co najmniej trzecim przewlekłej choroby nerek liczyła 113 osób w tym 41 (36,3%) kobiet i 72 (63,7%) mężczyzn w średnim wieku $35,2 \pm 16,2$ roku. W przypadku 55 chorych (48,7%) rozpoznanie PKZN



years), had a higher body mass index (28.5 ± 4.3 vs. 24.9 ± 3.2 kg/m²), and lower eGFR (78.3 ± 15.5 vs. 92.8 ± 19.0 ml/min/1.73 m²).

The distribution of genotypes and alleles of the studied polymorphisms is presented in Tables 1–3.

The frequencies of rs13335818 polymorphism genotypes in the experimental group compared to the controls were 76.8% vs 73.7% for CC, 20.5% vs 24.7% for CT and 2.7% vs 1.6% for TT. The lowest frequency was found for the T allele, for which the MAF (Minor Allele Frequency) in the experimental group was 0.13.

The frequencies of rs4293393 polymorphism genotypes in the experimental group compared to the controls were 78.4% vs 71.1% for AA, 18.9% vs 27.3% for AG and 2.7% vs 1.6% for GG. The MAF for the G allele was 0.12 and 0.15, respectively.

The frequencies of rs13333226 polymorphism genotypes in the experimental group compared to controls were 77.0% vs 71.1% for AA, 20.3% vs 27.3% for AG and 2.7% vs 1.6% for GG. The G allele had the lowest frequency, with an MAF of 0.12 and 0.15, respectively.

The frequencies of the genotypes of the analysed UMOD variants in patients with CGN and the controls did not differ significantly from the distribution predicted by the Hardy-Weinberg law.

No significant differences in the distribution of genotypes between the experimental group and the controls were identified for any of the three analysed UMOD polymorphisms. Similar findings were made from the analysis considering the history of hypertension.

zostało w przeszłości potwierdzone wynikiem biopsji nerki. W czasie prowadzenia badania średnia filtracja kłębuszkowa chorych wynosiła $28,4 \pm 25,3$ ml/min/1,73 m². Spośród badanych 13% osób było leczonych zachowawczo, u 48% stosowano dializoterapię, a u 39% wykonano zabieg przeszczepienia nerki. 102 chorych (90,3%) miało w wywiadzie współistniejące z PChN nadciśnienie tętnicze.

Po wykluczeniu osób z filtracją kłębuszkową mniejszą niż 60 ml/min/1,73 m², do grupy kontrolnej zakwalifikowano 196 osób: 92 kobiety (46,9%) i 104 mężczyzn (53,1%) w średnim wieku $48,6 \pm 17,2$ roku. W obrębie tej grupy na nadciśnienie tętnicze chorowało 77 osób (39,3%). Różniły się one istotnie statystycznie od osób bez nadciśnienia tętniczego w wywiadzie: starszym wiekiem ($60,5 \pm 12,0$ vs $40,1 \pm 15,7$ roku), wyższym wskaźnikiem masy ciała ($28,5 \pm 4,3$ vs $24,9 \pm 3,2$ kg/m²) i niższą filtracją kłębuszkową ($78,3 \pm 15,5$ vs $92,8 \pm 19,0$ ml/min/1,73 m²).

Rozkład genotypów i alleli badanych polimorfizmów prezentują tabele I–III.

W zakresie polimorfizmu rs13335818 w grupach badanej i kontrolnej stwierdzono genotyp CC odpowiednio u 76,8% vs 73,7% badanych, CT u 20,5% vs 24,7% oraz TT u 2,7% vs 1,6% osób. Z mniejszą częstością występował allel T, dla którego w grupie badanej MAF (Minor Allele Frequency) wynosił 0,13. Analizując rozkład genotypów polimorfizmu rs4293393 odpowiednio w grupach badanej i kontrolnej, wykazano genotyp AA u 78,4% vs 71,1% osób, AG 18,9% vs 27,3% i GG 2,7% vs 1,6%. Wskaźnik MAF dla allelu G wynosił odpowiednio 0,12 i 0,15.

Table I. Distribution of genotypes and alleles of UMOD polymorphism rs13335818 in analysed groups; χ^2 test (p = ns)
Tabela I. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs13335818 genu UMOD w grupach badanych; test χ^2 (p = ns)

rs13335818	Experimental group/ Grupa badana	All controls/ Grupa kontrolna wszyscy	Controls without HT/ Grupa kontrolna bez NT	Controls with HT/ Grupa kontrolna z NT
CC	86 (76,8%)	143 (73,7%)	82 (69,5%)	61 (80,3%)
CT	23 (20,5%)	48 (24,7%)	35 (29,7%)	13 (17,1%)
TT	3 (2,7%)	3 (1,6%)	1 (0,8%)	2 (2,6%)
CT+TT	26 (23,2%)	51 (26,3%)	36 (30,5%)	15 (19,7%)
allele C	195 (87,1%)	334 (87,1%)	199 (84,3%)	135 (88,8%)
allele T	29 (12,9%)	54 (13,9%)	37 (15,7%)	17 (11,2%)

HT – hypertension/NT – nadciśnienie tętnicze

Table II. Distribution of genotypes and alleles of UMOD polymorphism rs4293393 in analysed groups; χ^2 test (p = ns)
Tabela II. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs4293393 genu UMOD w grupach badanych; test χ^2 (p = ns)

rs4293393	Experimental group/ Grupa badana	All controls/ Grupa kontrolna wszyscy	Controls without HT/ Grupa kontrolna bez NT	Controls with HT/ Grupa kontrolna z NT
AA	87 (78,4%)	138 (71,1%)	79 (67%)	59 (77,6%)
AG	21 (18,9%)	53 (27,3%)	38 (32,2%)	15 (19,8%)
GG	3 (2,7%)	3 (1,6%)	1 (0,8%)	2 (2,6%)
AG+GG	24 (21,6%)	56 (28,9%)	39 (33%)	17 (22,4%)
A allele	195 (87,8%)	329 (84,8%)	196 (83%)	133 (87,5%)
G allele	27 (12,2%)	59 (15,2%)	40 (17%)	19 (12,5%)



Table III. Distribution of genotypes and alleles of UMOD polymorphism rs13333226 in analysed groups; χ^2 test ($p = ns$)
 Tabela III. Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu rs13333226 genu UMOD w grupach badanych; test χ^2 ($p = ns$)

rs13333226	Experimental group/ Grupa badana	All controls/ Grupa kontrolna wszyscy	Controls without HT/ Grupa kontrolna bez NT	Controls with HT/ Grupa kontrolna z NT
AA	87 (77%)	138 (71.1%)	79 (67%)	59 (77.6%)
AG	23 (20.3%)	53 (27.3%)	38 (32.2%)	15 (19.8%)
GG	3 (2.7%)	3 (1.6%)	1 (0.8%)	2 (2.6%)
AG+GG	24 (21.6%)	56 (28.9%)	39 (33%)	17 (22.4%)
A allele	195 (87.8%)	329 (84.8%)	196 (83%)	133 (87.5%)
G allele	27 (12.2%)	59 (15.2%)	40 (17%)	19 (12.5%)

DISCUSSION

Chronic glomerulonephritis (CGN) is a term used to refer to several diseases with different clinical courses and different prognoses. They are characterised by damage to the basement membrane of the glomeruli caused by inflammation of an immunological aetiology. CGN is manifested by increased urinary excretion of numerous proinflammatory cytokines [37,38]. Literature data suggest a strong correlation between elevated urinary cytokine excretion and the severity of the disease and the progression rate of kidney injury [38,39,40]. An association of urinary TNF α excretion with the degree of disease activity was found in patients with active proliferative glomerulopathy [41]. In subjects with FSNGN (focal segmental necrotizing glomerulonephritis), the number of crescents identified in kidney biopsy correlated with the urinary excretion of TGF β and interleukin-15, whereas increased excretion of EGF, IL-2 and IL-9 was a positive predictor of a milder course of the disease [38]. The biochemical analysis of casts found in the urine of patients with CGN revealed that they contain immunoglobulins and complement components, in addition to uromodulin, albumin and fibrinogen [42]. There are also reports suggesting the suitability of urinary protein analysis (including uromodulin or fragments thereof) for the diagnosis and prognosis of CGN [43,44]. According to the hypothesis proposed by El-Achkar and Wu in 2012, uromodulin, because of its broad spectrum of activity, is the main protector of homeostasis in the urinary system [6]. By interacting with different receptors located on various cells, it triggers either a pro-inflammatory or anti-inflammatory response [6,45]. It also probably acts as a specific mechanical trap, scavenging and inactivating free cytokines filtered in glomeruli [46].

With this in mind, it can be suspected that changes in the structure and/or function of uromodulin may have a significant influence on the course of inflammation in chronic glomerulonephritis. In fact, Olczak et al. demonstrated that the urine of patients with CGN con-

W grupach badanej i kontrolnej rozkład genotypów polimorfizmu rs13333226 był następujący: AA 77,0% vs 71,1%, AG 20,3% vs 27,3% i GG 2,7% vs 1,6%. Rzadko występującym allelem w obu grupach był allel G z MAF odpowiednio: 0,12 i 0,15.

Rozkład częstości występowania genotypów badanych polimorfizmów UMOD nie różnił się istotnie od rozkładu przewidywanego prawem Hardy-Weinberga zarówno w grupie osób z PKZN, jak i w grupie kontrolnej.

W zakresie żadnego z trzech badanych polimorfizmów UMOD nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupami badaną a kontrolną. Analogiczne wyniki uzyskano również po uwzględnieniu w wywiadzie nadciśnienia tętniczego.

DYSKUSJA

Przewlekłe kłębuszkowe zapalenia nerek (PKZN) to grupa chorób o różnym przebiegu klinicznym i różnym rokowaniu. Ich wspólną cechą jest uszkodzenie błony podstawnej kłębuszków nerkowych, do którego prowadzi proces zapalny mający podłoże immunologiczne. W przebiegu PKZN obserwuje się zwiększone wydalanie z moczem licznych cytokin prozapalnych [37,38]. Dane literaturowe sugerują ścisłą zależność zwiększonego wydalania cytokin z moczem ze stopniem ciężkości choroby i tempem progresji uszkodzenia nerek [38,39,40]. U osób z aktywną glomerulopatią proliferacyjną stwierdzono związek wydalania TNF α z moczem ze stopniem aktywności choroby [41]. W przypadku FSNGN (*focal segmental necrotizing glomerulonephritis*) liczba stwierdzanych w biopsji nerki półksiężyców korelowała z wydalaniem w moczu TGF β i interleukiny 15, zaś zwiększone wydalanie EGF, IL-2 i IL-9 było korzystnym czynnikiem rokowniczym łagodniejszego przebiegu choroby [38]. Analiza biochemiczna wałeczków znajdujących w moczu osób chorujących na PKZN wskazuje, że zawierają one poza uromoduliną, albuminami i fibrynogenem także immunoglobuliny oraz składowe do-



tains structurally modified uromodulin containing a greater amount of N-acetylgalactosamine [47].

Based on this information, the authors of the article decided to assess the relationship between the three selected strongly coupled UMOD polymorphisms and the risk of chronic kidney damage caused by chronic glomerulonephritis. The polymorphisms were selected because of the authors' previous findings indicating a significantly higher inheritance of the T allele at rs4293393, A allele at rs13333226 and C allele at rs13335818 of the uromodulin gene from parents to children with this disease (unpublished data).

The rs13335818 polymorphism, located in exon 3 of the UMOD gene, is a synonymous polymorphism that is potentially biologically silent because it does not alter the amino acid sequence in the uromodulin protein chain. However, according to ENCODE, the region of this polymorphism shows strong regulatory activity [48,49]. The other two analysed polymorphisms, rs4293393 and rs13333226, are located in the non-coding section of the gene, but many data indicate that the non-coding fragments of the human genome are biologically active and affect gene expression [50,51]. In fact, the study by Padmanabhan et al. demonstrated that the G allele at rs13335818 was associated with lower urinary excretion of uromodulin [22]. Kottgen et al. on the other hand, found lower urinary excretion of uromodulin in carriers of the C allele in the rs4293393 polymorphism [21]. Thus, there are grounds to believe that the analysed polymorphisms, by influencing the expression of the UMOD gene, modify the physiological function of uromodulin, which may be a risk factor for irreversible kidney damage.

However, the present study designed in the case-control model did not confirm our initial assumptions, and did not show any association between UMOD polymorphisms (rs13335818, rs4293393 and rs13333226) and chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis.

There are several possible reasons for these results, which at the same time show the limitations of the study. For example, family studies are more sensitive than population studies conducted in the case-control model. The latter require the selection of sufficiently numerous and phenotypically pure experimental groups. Unfortunately, in our study, the histopathological assessment of a kidney biopsy, necessary for conclusive confirmation of the underlying disease, was not performed in all the patients. The experimental group certainly included patients with various histopathological types of CGN which often have a different pathogenesis but also different long-term prognoses. For reasons beyond their control, the authors did not have access to the complete medical records of the patients, hence unfortunately the coexistence of CGN and other conditions that could deteriorate renal func-

pełniacza [42]. Istnieją doniesienia sugerujące wykorzystanie analizy składu białek moczu (w tym uromoduliny lub jej fragmentów) do celów diagnostyczno-rokowniczych w przypadku PKZN [43,44]. Według zaprezentowanej w 2012 r. przez El-Achkara i Wu hipotezy, uromodulina poprzez bardzo szerokie spektrum swoich działań jest głównym strażnikiem homeostazy w układzie moczowym [6]. Oddziałując z różnymi receptorami zlokalizowanymi na różnych komórkach, uruchamia ona w miarę potrzeby albo odpowiedź prozapalną albo przeciwzapalną [6,45]. Prawdopodobnie działa ponadto jak swoista mechaniczna pułapka, wyłapując i inaktywując przefiltrowane w kłębuszku wolne cytokiny [46].

Mając powyższe na uwadze, można podejrzewać, że zmiany dotyczące budowy lub/i funkcji uromoduliny mogą istotnie wpływać na przebieg stanu zapalnego w przypadku przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek. W istocie Olczak i wsp. wykazali w moczu chorujących na PKZN zmienioną budowę uromoduliny prezentującej większą ilość N-acetylogalaktozami-ny [47].

Bazując na tych danych autorzy artykułu podjęli się oceny związku wybranych trzech, silnie ze sobą sprzężonych polimorfizmów UMOD z występowaniem przewlekłego uszkodzenia nerek w przebiegu przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek. Do wyboru polimorfizmów skłoniły autorów wcześniejsze wyniki własnych badań wskazujące na istotnie częstsze przekazywanie przez rodziców potomkom obciążonym tą chorobą allelu T polimorfizmu rs4293393, allelu A polimorfizmu rs 13333226 oraz allelu C polimorfizmu rs 13335818 genu uromoduliny (dane niepublikowane).

Polimorfizm rs13335818, zlokalizowany w egzonie 3 genu, jest polimorfizmem synonimowym, czyli potencjalnie biologicznie niemy, nie zmienia bowiem sekwencji aminokwasowej w łańcuchu białkowym uromoduliny. Według bazy ENCODE, region tego polimorfizmu wykazuje jednak silną aktywność regulacyjną [48,49]. Pozostałe dwa badane polimorfizmy, rs4293393 i rs13333226, są zlokalizowane w części niekodującej genu, ale wiele danych wskazuje, że fragmenty niekodujące naszego genomu są aktywne biologicznie i wpływają na ekspresję genów [50,51]. W istocie w badaniach Padmanabhana i wsp. allel G rs13335818 wykazywał związek ze zmniejszonym wydalaniem uromoduliny z moczem [22]. Kottgen i wsp. stwierdzili z kolei zmniejszone wydalanie uromoduliny z moczem u nosicieli allelu C polimorfizmu rs4293393 [21]. Istnieją więc podstawy, by sądzić, że badane przez nas polimorfizmy poprzez wpływ na ekspresję genu UMOD modyfikują fizjologiczne funkcje uromoduliny, co może stanowić czynnik ryzyka nieodwracalnego uszkodzenia nerek.

Aktualne badanie, przeprowadzone w schemacie „badany vs kontrola”, nie potwierdziło jednakże naszych



tion *per se* cannot be ruled out. For the same reason, for most patients the authors had no data necessary to assess the progression rate of chronic kidney disease and to correlate it with the analysed UMOD polymorphisms. A conclusive assessment of the effect of co-existing hypertension on the obtained results was impossible because of the insufficiently large group size. The control subjects were only screened for kidney disease, but this group also included elderly people who were overweight/obese, and thus *a priori* at risk of chronic kidney injury.

These observations suggest that future research protocols (population studies, selection of 'phenotypically pure' control and experimental groups, analysis of CKD progression) should be optimised. Nevertheless, the obtained findings do not diminish the need for further research into the role of uromodulin and its genetic variants in kidney disease pathogenesis.

CONCLUSIONS

The study did not demonstrate any association between UMOD polymorphisms rs13335818, rs4293393 and rs13333226 and the risk of chronic kidney disease caused by chronic glomerulonephritis.

The study was executed under project no. KNW-1-120/N/3/0.

wstępnych założeń i nie wykazało związku żadnego z badanymi polimorfizmami (rs13335818, rs4293393 i rs13333226) genu UMOD z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek.

Istnieje kilka prawdopodobnych przyczyn uzyskania takich wyników, które stanowią równocześnie ograniczenie przeprowadzonego badania. Badanie rodzin jest czulsze niż badanie populacyjne prowadzone w schemacie „przypadek vs kontrola”. To ostatnie bowiem wymaga selekcji wystarczająco licznych i czystych fenotypowo grup badanych. Niestety, w przypadku naszego badania nie u wszystkich chorych dysponowaliśmy oceną histopatologiczną biopsji nerek, co pozwalałoby jednoznacznie potwierdzić rozpoznanie choroby podstawowej. W grupie badanej znaleźli się na pewno chorzy z różnymi typami histopatologicznymi PKZ, które częstokroć mają nie tylko różne tło patogenetyczne, lecz także różne rokowanie odległe. Z przyczyn niezależnych autorzy nie mieli wglądu w kompletne dokumentacje medyczne chorych, stąd nie można niestety wykluczyć nałożenia na PKZ innych schorzeń, które mogły *per se* prowadzić do pogorszenia funkcji nerek. Z tego samego względu w przypadku większości chorych autorzy nie dysponowali danymi, które pozwoliłyby na ocenę tempa progresji przewlekłej choroby nerek i skorelowania go z badanymi polimorfizmami UMOD. Zbyt małe grupy badane uniemożliwiły jednoznaczną ocenę wpływu współistniejącego nadciśnienia na uzyskane wyniki. Chorym z grupy kontrolnej wykonano jedynie badania przesiewowe w kierunku chorób nerek. Tymczasem były wśród nich także osoby starsze, mające nadwagę/otyłość, a więc będące *a priori* w grupie ryzyka przewlekłego uszkodzenia nerek.

Powyższe spostrzeżenia sugerują kierunki optymalizacji przyszłych protokołów badawczych (badanie o zakresie populacyjnym, selekcja „czystych fenotypowo” grup badanej i kontrolnej, analiza progresji PChN), a uzyskane wyniki nie umniejszają celowości prowadzenia dalszych badań nad rolą uromoduliny i jej zmienności genetycznej w patogenezie chorób nerek.

WNIOSKI

Nie wykazano związku polimorfizmów rs13335818, rs4293393 i rs13333226 genu UMOD z występowaniem przewlekłej choroby nerek na tle przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek.

Praca została zrealizowana w ramach KNW-1-120/N/3/0.



REFERENCES

1. Kokot F., Dulawa J. Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron*. 2000; 85(2): 97–102.
2. Serafini-Cessi F., Malagolini N., Cavallone D. Tamm-Horsfall glycol-protein: biology and clinical relevance. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 42(4): 658–676.
3. Devuyt O., Dahan K., Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20(7): 1290–1294.
4. Vyletal P., Bleyer A.J., Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology – an update. *Kidney Blood Press Res.* 2010; 33(6): 456–475.
5. Rampoldi L., Scolari F., Amoroso A., Ghiggeri G.M., Devuyt O. The rediscovery of uromodulin (Tamm–Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 80(4): 338–347.
6. El-Achkar T.M., Wu X.R. Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander or protector? *Am. J. Kidney Dis.* 2012; 59(3): 452–461.
7. Iorember F.M., Vehaskari V.M. Uromodulin: old friend with new roles in health and disease. *Pediatr. Nephrol.* 2014; 29(7): 1151–1158.
8. Zaucke F., Boehnlein J.M., Steffens S., Polishchuk R.S., Rampoldi L., Fischer A., Pasch A., Boehm C.W., Baasner A., Attanasio M., Hoppe B., Hopfer H., Beck B.B., Sayer J.A., Hildebrandt F., Wolf M.T. Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(10): 1985–1997.
9. Benetti E., Caridi G., Vella M.D., Rampoldi L., Ghiggeri G.M., Artifoni L., Murer L. Immature renal structures associated with a novel sequence variant. *Am. J. Kid. Dis.* 2009; 53(2): 327–331.
10. Renigunta A., Renigunta V., Saritas T., Decher N., Mutig K., Waldegger S. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(3): 2224–2235.
11. Zacchia M., Capasso G. The importance of uromodulin as regulator of salt reabsorption along the thick ascending limb. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2015; 30(2): 158–160.
12. Hession C., Decker J.M., Sherblom A.P. et al. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. *Science* 1987; 237(4821): 1479–1484.
13. Krefit B., Jabs W.J., Laskay T., Klinger M., Solbach W., Kumar S., van Zandbergen G. Polarized expression of Tamm-Horsfall protein by renal tubular epithelial cells activates human granulocytes. *Infect. Immun.* 2002; 70(5): 2650–2656.
14. Orskov I., Ferencz A., Orskov F. Tam-Horsfall protein or uromucoid is the normal urine slime that traps type I fimbriated *Escherichia coli*. *Lancet* 1980; 1(8173): 887.
15. Duncan J.L. Differential effect of Tamm-Horsfall protein on adherence of *Escherichia coli* to transitional epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 1988; 158(6): 1379–1381.
16. Baldwin R.L., Chang M.P., Bramhall J., Grave S., Bonavida B., Wisniewski B.J. Capacity of tumor necrosis factor to bind and penetrate membranes is pH-dependent. *J. Immunol.* 1988; 141(7): 2352–2357.
17. Muchmore A.V., Decker J.M. Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science* 1985; 229(4712): 479–481.
18. Kumar S., Muchmore A. Tamm-Horsfall protein – uromodulin (1950–1990). *Kidney Int.* 1990; 37: 1395–1401.
19. Wimmer T., Cohen G., Säemann M.D., Hörl W.H. Effects of Tamm-Horsfall protein on polymorphonuclear leukocyte function. *Nephrol Dial. Transplant.* 2004; 19(9): 2192–2197.
20. Köttgen A., Glazer N.L., Dehghan A., Hwang S.J., Katz R., Li M., Yang Q., Gudnason V., Launer N.L., Harris T.B., Smith A.V., Arking D.E., Astor B.C., Boerwinkle E., Ehret G.B., Ruczinski I., Scharpf R.B., Chen Y.D., de Boer I.H., Haritunians T., Lumley T., Sarnak M., Siscovick D., Benjamin E.J., Levy D., Upadhyay A., Aulchenko Y.S., Hofman A., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., van Duijn C.M., Chasman D.I., Paré G., Ridker M., Kao W.H., Witteman J.C., Coresh J., Shlipak M.G., Fox C.S. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2009; 41(6): 712–717.
21. Köttgen A., Hwang S.J., Larson M.G., Van Eyk J.E., Fu Q., Benjamin E.J., Dehghan A., Glazer N.L., Kao W.H., Harris T.B., Gudnason V., Shlipak M.G., Yang Q., Coresh J., Levy D., Fox C.S. Uromodulin levels associate with a common UMOD variant and risk for incident CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21(2): 337–344.
22. Padmanabhan S., Melander O., Johnson T. et al. Global BPgenConsortium, Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS Genet.* 2010; 6(10): e1001177.
23. Gudbjartsson D.F., Holm H., Indridason O.S., Thorleifsson G., Edvardsson V., Sulem P., de Vegt F., d'Ancona F.C., den Heijer M., Wetzels J.F., Franzson L., Rafnar T., Kristjansson K., Bjornsdottir U.S., Eyjolfsson G.I., Kiemeny L.A., Kong A., Palsson R., Thorsteinsdottir U., Stefansson K. Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones-role of age and comorbid diseases. *PLoS Genet.* 2010; 6(7): e1001039. Erratum in: *PLoS Genet.* 2010; 6, 11.
24. Möllsten A., Torffvit O. Tamm-Horsfall protein gene is associated with distal tubular dysfunction in patients with type 1 diabetes. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2010; 44(6): 438–444.
25. Reznichenko A., Böger C.A., Snieder H., van den Born J., de Borst M.H., Damman J., van Dijk M.C., van Goor H., Hepkema B.G., Hillebrands J.L., Leuvenink H.G., Niesing J., Bakker S.J., Seelen M., Navis G. UMOD as a susceptibility gene for end-stage renal disease. *BMC Med. Genet.* 2012; 13: 78.
26. Böger C.A., Gorski M., Li M., Hoffmann M.M., Huang C., Yang Q., Teumer A., Krane V., O'Seaghdha C.M., Kutalik Z., Wichmann H.E., Haak T., Boes E., Coassin S., Coresh J., Kollerits B., Haun M., Paulweber B., Köttgen A., Li G., Shlipak M.G., Powe N., Hwang S.J., Dehghan A., Rivadeneira F., Uitterlinden A., Hofman A., Beckmann J.S., Krämer B.K., Witteman J., Bochud M., Siscovick D., Rettig R., Kronenberg F., Wanner C., Thadhani R.I., Heid I.M., Fox C.S., Kao W.H. Association of eGFR-related loci identified by GWAS with incident CKD and ESRD. *PLoS Genet.* 2011; 7(9): e1002292.
27. Chambers J.C., Zhang W., Lord G.M. et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2010; 42(5): 373–375.
28. Pattaro C., De Grandi A., Vitart V. et al. A meta-analysis of genome-wide data from five European isolates reveals an association of COL22A1, SYT1, and GABRR2 with serum creatinine level. *BMC Med. Genet.* 2010; 11, 11: 41.
29. Vyletal P., Bleyer A.J., Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology-anupdate. *Kidney Blood Press Res.* 2010; 33(6): 456–475.
30. Prąjczek S., Heidenreich U., Pfaller W., Kotanko P., Lhotta K., Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010; 25(6): 1896–1903.
31. Jha V., Wang A.Y., Wang H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. *Nephrol. Dial. Transplant* 2012; 27, Suppl. 3: iii32–iii38
32. Divers J., Freedman B.I. Susceptibility genes in common complex kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2010; 19(1): 79–84.
33. Mancia G., de Backer G., Dominiczak A. et al. Management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of cardiology. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension; the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 2007; 25(6): 1105–1187.
34. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004; 114, 2 Suppl.: 555–576.
35. Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B., Greene T., Rogers N., Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Int. Med.* 1999; 130(6): 461–470.
36. Schwartz G.J., Munoz A., Schneider M.F., Mak R.H., Kaskel F., Warady B.A., Furth S.L. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20(3): 629–637.
37. Tsai C.Y., Wu T.H., Yu C.L., Lu J.Y., Tsai Y.Y. Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron.* 2000; 85(3): 207–214.
38. Stangou M., Papagianni A., Bantis C., Liakou H., Pliakos K., Giamalis P., Gionanlis L., Pantzaki A., Efstratiadis G., Memmos D. Detection of multiple cytokines in the urine of patients with focal necrotising glomerulonephritis may predict short and long term outcome of renal function. *Cytokine* 2012; 57(1): 120–126.



39. Ortega L.M., Fornoni A. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *Int. J. Interferon. Cytokine Mediator Res.* 2010; (2): 49–62.
40. Karkar A. Cytokines and glomerulonephritis. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 2004; (15): 473–485.
41. Ozen S., Saatci O., Tinaztepe K., Bakkaloglu A., Barut A. Urinary tumor necrosis factor levels in primary glomerulopathies. *Nephron.* 1994; (66): 291–294.
42. Anders D., Thoenes W. Fine structural evidence of Tamm-Horsfall protein as a constituent of tubular casts in the nephrotic syndrome. *Contrib. Nephrol.* 1981; (24): 42–52.
43. Navarro-Muñoz M., Ibernon M., Bonet J., Pérez V., Pastor M.C., Bayés B., Casado-Vela J., Navarro M., Ara J., Espinal A., Fluvia L., Serra A., López D., Romero R. Uromodulin and $\alpha(1)$ -antitrypsin urinary peptide analysis to differentiate glomerular kidney diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2012; 35(5): 314–325.
44. Wu J., Wang N., Wang J., Xie Y., Li Y., Liang T., Wang J., Yin Z., He K., Chen X. Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(14): 1971–1978.
45. Schmid M., Prajczek S., Gruber L.N., Bertocchi C., Gandini R., Pfaller W., Jennings P., Joannidis M. Uromodulin facilitates neutrophil migration across renal epithelial monolayers. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010; 26(3): 311–318.
46. Liu Y., El-Achkar T.M., Wu X.R. Tamm-Horsfall protein regulates circulating and renal cytokines by affecting glomerular filtration rate and acting as a urinary cytokine trap. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(20): 16365–16378.
47. Olezak T., Olezak M., Kubicz A., Duława J., Kokot F. Composition of the sugar moiety of Tamm-Horsfall protein in patients with urinary diseases. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1999; 29(2): 68–74.
48. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgS_doOtherUser=submit&hgS_otherUserName=jeales&hgS_otherUserSessionName=UMOD%2Drs13335818 [dostep]
49. Gerstein M.B., Kundaje A., Hariharan M. et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 2012; 489(7414): 91–100.
50. Trudu M., Janas S., Lanzani C., Debaix H., Schaeffer C., Ikehata M., Citterio L., Demaretz S., Trevisani F., Ristagno G., Glaudemans B., Laghmani K., Dell'Antonio G. Swiss Kidney Project on Genes in Hypertension (SKIPOGH) team, Loffing J., Rastaldi M.P., Manunta P., Devuyt O., Rampoldi L. Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression. *Nat Med.* 2013; 19(12): 1655–1660.
51. Olden M., Corre T., Hayward C. et al. Common variants in UMOD associate with urinary uromodulin levels: a meta-analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25(8): 1869–1882.