

# El pentosán polisulfato de sodio previene las alteraciones morfológicas renales y la albuminuria en ratas con diabetes tipo 1

Y. Mathison Natera<sup>1</sup>, H.J. Finol<sup>2</sup>, Z. Quero<sup>1</sup>, R. González<sup>2</sup>, J. González<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Farmacología. Escuela José María Vargas. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas (Venezuela)

<sup>2</sup> Centro de Microscopía Electrónica Dr. Mitsuo Ogura. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas (Venezuela)

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas. Universidad de Carabobo. Valencia (Venezuela)

Nefrología 2010;30(6):639-45

10.3265/Nefrologia.pre2010.Jul.10543

## RESUMEN

Se ha reportado una disminución de los valores de glicosaminoglicanos (GAG) en el riñón y otros órganos en modelos experimentales de diabetes y en humanos. La administración a largo plazo de heparina y otros GAG previene las alteraciones morfológicas y funcionales del riñón en ratas diabéticas. Evaluamos el efecto del pentosán polisulfato de sodio (PPSNa), un mucopolisacárido semisintético similar a los GAG y de baja actividad anticoagulante, sobre la función renal y los cambios estructurales en ratas diabéticas. La diabetes fue inducida a ratas Sprague-Dawley mediante la administración i.v. de estreptozotocina (STZ). Los animales fueron distribuidos al azar en tres grupos (C = control, STZ y STZ + PPSNa = pretratados con 15 mg/kg/día de PPSNa s.c.). Después de 3 meses se tomaron muestras de sangre y de orina de 24 horas; los animales fueron sacrificados y los riñones extraídos mediante microdissección para el análisis morfométrico. Los animales del grupo STZ presentaron un incremento importante de la excreción de albúmina en orina (C =  $0,26 \pm 0,03$  frente a STZ =  $7,75 \pm 1,8$  mg/24 h), que fue parcialmente revertido por el pretratamiento con PPSNa ( $3,7 \pm 0,7$  mg/24 h), sin afectar al control metabólico, HbA<sub>1c</sub> (C =  $3,6 \pm 1,7$ ; STZ =  $8,82 \pm 0,47$ ; STZ + PPSNa =  $8,63 \pm 0,54$ ). En las micrografías electrónicas se observan las lesiones renales típicas descritas en la diabetes experimental (grupo STZ). La administración de PPSNa previene el engrosamiento de la membrana basal tubular y la pérdida de la citoarquitectura inducida por la diabetes. Nuestros resultados demuestran que la administración de PPSNa previene parcialmente el daño renal en este modelo experimental y sugieren un potencial uso terapéutico de este compuesto.

**Palabras clave:** Microalbuminuria. Glicosaminoglicanos. Daño renal. Diabetes.

**Correspondencia:** Yaira Mathison Natera

Cátedra de Farmacología. Escuela José María Vargas.

Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Calle LaTrinidad Res. Uracoa Apto, 10-B, Santa Paula, 1060, Caracas, Venezuela.

yaira57@yahoo.com

## *Pentosan polysulfate sodium prevents kidney morphological changes and albuminuria in rats with type 1 diabetes*

### ABSTRACT

*Decreased levels of glycosaminoglycans (GAG) have been observed in kidney and other organs, in human and animal models of diabetes. Long term administration of heparins and other glycosaminoglycans have demonstrated a beneficial effect on morphological and functional renal abnormalities in diabetic rats. We assessed the effect of sodium pentosan polysulfate (SPP), a semi-synthetic glycosaminoglycan with low anticoagulant activity, on renal involvement in streptozotocin diabetic rats. Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats by i.v. administration of streptozotocin (STZ). Animals were randomly allocated in three groups: C = control, STZ and STZ + SPP = pretreated with SPP (15 mg/kg, s.c.). After three months of follow-up, blood and 24 h-urine samples were obtained and then the animals were sacrificed and the kidney microdissected for morphometric analysis. Urinary albumin excretion was markedly increased in untreated diabetic rats (C =  $0.26 \pm 0.03$  vs. STZ =  $7.75 \pm 1.8$  mg/24 h) and SPP treatment partially prevented the albumin rise ( $3.7 \pm 0.7$  mg/24 h), without affecting the metabolic control HbA<sub>1c</sub> (C =  $3.6 \pm 1.7$ ; STZ =  $8.82 \pm 0.47$ ; STZ + SPP =  $8.63 \pm 0.54$ ). Electron microscope observation revealed typical renal lesions described in experimental diabetes (STZ group). SPP administration prevent the tubular basement membrane thickening and the lost of cytoarchitecture induced by experimental diabetes. Our data demonstrated that long-term administration of SPP have a favorable effect on morphological and functional abnormalities in kidney of diabetic rats and suggests a potential therapeutic use for this compound.*

**Key words:** Microalbuminuria. Glycosaminoglycans. Renal abnormalities. Diabetes.

## INTRODUCCIÓN

La eficacia de los glicosaminoglicanos (GAG) para disminuir la excreción de albúmina en orina en la nefropatía diabética

ha sido ampliamente demostrada en diferentes estudios experimentales y en humanos<sup>13</sup>, lo que ha estimulado la investigación clínica con estos compuestos no sólo en esta patología sino también en otras complicaciones microvasculares de la diabetes<sup>4,5</sup> y en diferentes tipos de glomerulonefritis<sup>6</sup>.

Se han realizado estudios con moléculas modificadas, tratando de obtener preparaciones con poca actividad anticoagulante para mejorar el perfil de seguridad. Las moléculas modificadas derivadas de heparina presentan una efectividad similar al dermatán sulfato para disminuir la excreción de albúmina y para inhibir la expresión del TGF $\beta$ 1, demostrando que la fracción heparina no es indispensable para la actividad<sup>7</sup>. Igualmente, se han realizado estudios con moléculas con diferente grado de sulfatación<sup>8</sup>, con proteoglicanos que unen TGF $\beta$  como el decorin<sup>9</sup>, y GAG con cadena similar al heparán sulfato, como el danaparoid sódico<sup>10</sup>, obteniéndose resultados diversos. Sin embargo, la mayor experiencia clínica se ha obtenido con el uso de la sulodexida, un GAG compuesto de una fracción de heparina de migración rápida y dermatán sulfato<sup>11-15</sup>.

El pentosán polisulfato de sodio (PPSNa) es un mucopolisacárido semisintético con estructura similar a los GAG, que ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de la cistitis intersticial, mostrando eficacia en el control de la sintomatología y un perfil de seguridad y una tolerancia adecuados en el rango de dosis utilizado<sup>16-18</sup>.

El PPSNa presenta cierta similitud de efectos con la sulodexida. Así, ambos tienen efecto fibrinolítico y activan la lipoproteína lipasa y la lipasa de triglicéridos hepática<sup>19-22</sup>, efectos que serían beneficiosos en el paciente diabético. La actividad anticoagulante del PPSNa es muy baja, unas 15 veces menor que la de la heparina; presenta un mejor perfil de absorción por vía oral que los GAG<sup>16</sup> y se ha demostrado en estudios *in vitro* que inhibe la proliferación celular mediada por factores de crecimiento que unen heparina<sup>23</sup>.

Los estudios farmacocinéticos en ratas, mediante la administración de PPSNa radiomarcado, demuestran que se concentra principalmente en los riñones y en el tracto urinario<sup>24</sup>, lo que sugiere un posible papel funcional en estas estructuras.

La posibilidad de que el PPSNa prevenga o disminuya la excreción de albúmina en la nefropatía diabética no ha sido evaluada. Para ello, nos proponemos evaluar si el PPSNa disminuye la excreción de albúmina en orina en ratas hechas diabéticas mediante la administración de estreptozotocina (STZ) y si puede prevenir los cambios morfológicos inducidos por la diabetes en el riñón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Los animales de experimentación fueron ratas albinas, machos, de la cepa Sprague-Dawley, de 6 a 7 semanas de edad,

con un peso comprendido entre 220 y 250 g, provenientes del bioterio de la Escuela José María Vargas, Facultad de Medicina, UCV, Caracas, las cuales fueron mantenidas con períodos alternos de luz y oscuridad, permitiéndoles libre acceso al agua y a la comida (comida estándar para ratas de laboratorio, que contiene aproximadamente un 20% de proteína).

Las ratas fueron asignadas al azar a dos grupos, un grupo control y otro al que se le indujo diabetes. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio<sup>25</sup>, y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Escuela de Medicina José María Vargas.

### Inducción de la diabetes experimental

La diabetes fue inducida mediante la administración de una inyección única de STZ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a una dosis de 60 mg/kg de peso, en la vena caudal. La inducción de la diabetes fue confirmada a los 2 y 7 días posteriores a la administración de STZ, mediante la determinación de los valores sanguíneos de glucosa utilizando un método enzimático (Glucose HK Reagent, Bayer). Se mantuvo un grupo control al que no se le indujo diabetes, al que sólo se le administró solución salina en la vena caudal. A los 7 días, los animales controles y aquellos a los cuales se les indujo diabetes fueron distribuidos al azar los siguientes grupos de tratamiento:

**Control:** solución salina o vehículo.

**STZ-Control:** STZ.

**STZ-PPSNa:** STZ + 15 mg/kg de peso/día de PPSNa por vía s.c., durante 3 meses.

El PPSNa fue administrado por vía subcutánea durante 5 días a la semana (de lunes a viernes). Los animales no recibieron insulina durante el experimento. Durante el período de seguimiento a los animales se les determinaron mensualmente el peso, la presión arterial y los valores de glucosa capilar. Al finalizar el período de tratamiento se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal de la cola para la determinación de la glicemia y de la HbA<sub>1c</sub>, y los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para recolectar orina durante 24 horas para determinar la albuminuria. Posteriormente fueron sacrificados, y se extrajeron los riñones mediante microdissección para el análisis morfológico.

La glicemia fue determinada en muestras de sangre mediante una prueba enzimática utilizando un equipo comercial (Glucose HK Reagent, Bayer). La HbA<sub>1c</sub> y la excreción de albúmina en orina se determinaron empleando equipos comerciales (DCA 2000®, Bayer).

## Determinación de la presión arterial

El registro de la presión arterial se realizó en ratas conscientes, utilizando un método no invasivo mediante el uso de un pletismógrafo digital de cola (LE 5000, LETICA Scientific Instrument, Barcelona, España).

Para producir la vasodilatación de los vasos periféricos, las ratas fueron sometidas a calentamiento (42 °C) durante 15 minutos, utilizando para ello una estufa (Memmert, 854 Schwabach, Alemania)<sup>26</sup>. Posteriormente fueron inmovilizados en un cepo, y se les colocó en la cola el dispositivo para determinación de la presión arterial conectado a un transductor de pulso, que permite el registro de este parámetro. Los valores reportados son el promedio de tres registros sucesivos.

## Análisis ultraestructural y morfométrico

Se extrajeron muestras de corteza renal de 2 mm de diámetro. Las muestras fueron fijadas en 3% de glutaraldehído y 1% de OsO<sub>4</sub> en tampón fosfato de Millonig (pH = 7,4, 320 mOsmol). Posteriormente fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol e incluidas en epón. Después de la inclusión, fueron seccionadas en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B, contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011, con un voltaje de aceleración de 80 kV.

El registro digital de las imágenes fue analizado con un programa de morfometría (Image-Tool versión 3.0), con el cual se midió el diámetro de la membrana basal (n = 16/cada tratamiento).

## Análisis estadístico

Los resultados se representan como la media ± error estándar de la media (EEM) y fueron graficados y analizados mediante los programas GraphPad Prism versión 4.1. y STATICS, versión 7. La comparación entre las medias aritméticas de los grupos fue realizada mediante análisis de varianza (ANOVA). Aquellos valores con p < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se exponen los valores del peso, la glicemia y el volumen urinario de los grupos estudiados. Los grupos a los cuales se les indujo diabetes muestran un incremento significativo en la glicemia y el volumen urinario excretado en 24 h, así como un menor peso comparados con el grupo control a los 3 meses de tratamiento.

La inducción de diabetes con STZ produjo un incremento significativo de la excreción urinaria de albúmina con respecto al grupo control (C = 0,26 ± 0,03; STZ = 7,8 ± 1,8 mg/24 h). El tratamiento durante 3 meses con PPSNa previno parcialmente este incremento (STZ + PPSNa = 3,7 ± 0,70 mg/24 h), disminuyendo la excreción de albúmina un 52,5% con respecto al grupo diabético no tratado (figura 1).

Los valores de HbA<sub>1c</sub> en los grupos de tratamiento fueron: C = 3,6 ± 1,7; STZ = 8,8 ± 0,47 y STZ + PPSNa = 8,65 ± 0,54%, evidenciándose que el tratamiento con PPSNa no modifica el incremento en los valores de HbA<sub>1c</sub> característicos de este modelo de diabetes. Además, se observa que no existen diferencias significativas entre los valores de la presión arterial media entre los diferentes grupos de tratamiento (C = 122,8 ± 5,1; STZ = 134,6 ± 12 y STZ + PPSNa = 110 ± 5,7 mmHg).

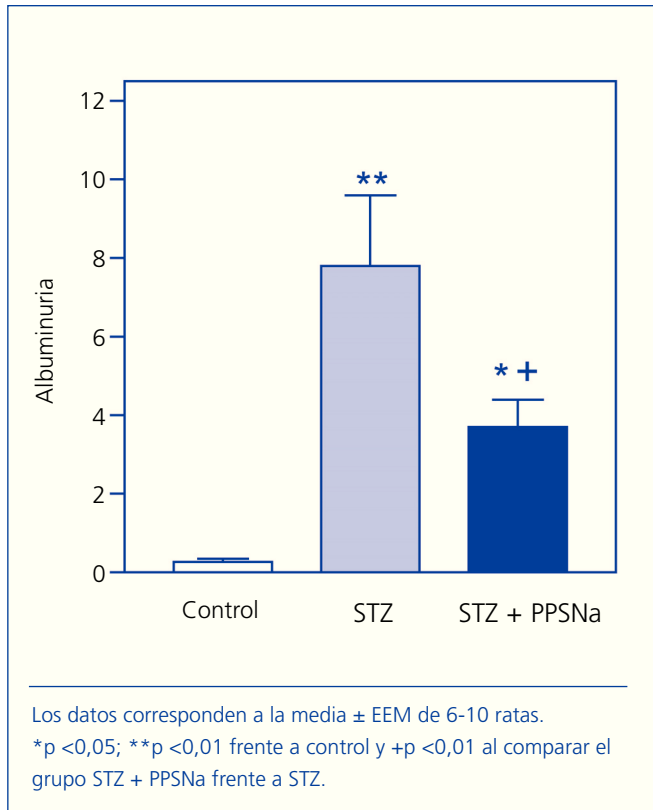
En las micrografías electrónicas (figura 2) se observa la apariencia normal de los túbulos renales en las ratas controles (A), con una disposición adecuada de las interdigitaciones y una membrana basal de grosor normal. Nótese que el capilar muestra un endotelio uniforme y de escaso grosor. Por el contrario, en el grupo STZ (B) se observa un importante daño tubular con pérdida de la citoarquitectura evidenciada por la desaparición de las interdigitaciones y engrosamiento de la membrana basal. El tratamiento con PPSNa (C) previene parcialmente la implantación del daño tubular, ya que se observa mayor número de interdigitaciones que en STZ, pero están dispuestas irregularmente y no se corresponden con el número de mitocondrias.

El análisis morfométrico del grosor de las membranas basales tubulares para los diferentes grupos de tratamiento (figura 3) revela los siguientes valores: C = 0,077 ± 0,003; STZ = 0,266 ± 0,021 y STZ + PPSNa = 0,082 ± 0,04 μm. El grosor de la

**Tabla 1.** Parámetros evaluados a los 3 meses

Pacientes	Control	STZ	STZ + PPSNa
Peso corporal (g)	383,1 ± 3,7	283 ± 7,1 <sup>a</sup>	299,7 ± 3,2 <sup>a</sup>
Glicemia (mg/dl)	95 ± 7,6	632 ± 27 <sup>a</sup>	556,8 ± 88 <sup>a</sup>
Vol. urinario (ml/24 h)	17,4 ± 0,4	109,3 ± 12,9 <sup>a</sup>	105,2 ± 25 <sup>a</sup>

Los datos corresponden a la media ± EEM de 6-10 ratas. <sup>a</sup> p < 0,01 frente a control.



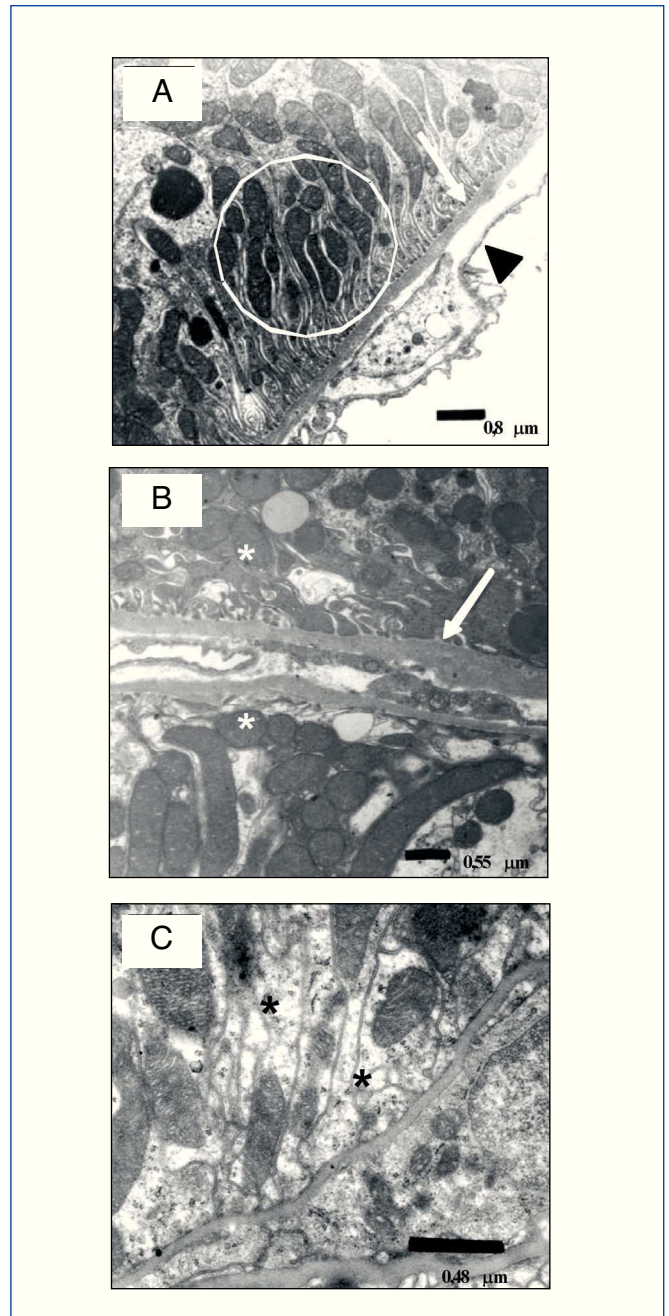
**Figura 1.** Excreción urinaria de albúmina en 24 h en las ratas control, diabéticas (STZ) y diabéticas tratadas con pentosán polisulfato de sodio (STZ + PPSNa).

membrana basal se incrementa de manera significativa en el grupo STZ al compararlo con el control, mientras que en el grupo de ratas con diabetes que recibe tratamiento con PPSNa el engrosamiento de la membrana basal es mucho menor, no presentando diferencia significativa con el grupo control y sí es estadísticamente diferente al grupo STZ.

## DISCUSIÓN

Los GAG, principalmente el heparán sulfato, son sintetizados en las células endoteliales y mesangiales, y después de un proceso de sulfatación en el aparato de Golgi, son incorporados en la matriz extracelular del glomérulo y de las grandes arterias, donde contribuyen a mantener la integridad estructural de la membrana basal y de la pared vascular<sup>27</sup>.

En la diabetes se ha referido una reducción generalizada de las cargas negativas de la matriz extracelular y de las membranas plasmáticas, asociada con una disminución del contenido de heparán sulfato o con cambios en su grado de sulfatación<sup>28-31</sup>. Esta alteración en la carga de la membrana basal se traduciría en la pérdida de selectividad por carga y facilitaría una eliminación incrementada de proteínas en la orina<sup>30,32</sup>.



**Figura 2.** (A) Control: disposición regular de las interdigitaciones y de las mitocondrias (círculo), membrana basal de grosor normal (flecha) y endotelio capilar uniforme (triángulo). Aumento x12.000. (B) STZ: pérdida de las interdigitaciones, mitocondrias dispuestas al azar (asteriscos) y membrana basal engrosada (flecha). Aumento x18.000. (C) STZ + PPSNa: interdigitaciones conservadas pero irregulares, espacios desprovistos de mitocondrias (asteriscos). Aumento x21.000.

Así, en modelos experimentales de diabetes en ratas y en ratones, se ha encontrado una disminución en la síntesis de proteoglicanos en el glomérulo y disminución del contenido de proteoglicanos unidos a heparán sulfato en la membrana ba-

sal<sup>33,34</sup>. Asimismo, se ha comunicado que el contenido de GAG está disminuido en los riñones y en la íntima de las aortas obtenidas por autopsia en pacientes diabéticos<sup>35,36</sup>, lo que sugiere que las alteraciones del metabolismo del heparán sulfato no están restringidas al riñón y pueden participar en patogenia de otras complicaciones de la diabetes.

Se ha demostrado que las alteraciones en el metabolismo de los GAG, producidas en un modelo de diabetes experimental en ratas, son susceptibles de ser modificadas mediante la administración exógena de los mismos, con la consiguiente restauración del funcionamiento normal del riñón<sup>12</sup>.

Nuestros resultados coinciden con lo referido en la bibliografía médica, ya que las alteraciones renales inducidas por la diabetes son parcialmente prevenidas por la administración de PPSNa durante los 3 meses posteriores a la administración de STZ en ratas.

La administración de PPSNa por vía subcutánea durante 3 meses previene el incremento en la excreción renal de albúmina en este modelo experimental, lo que coincide con lo comunicado previamente en la bibliografía médica<sup>12</sup>, y se corresponde con el efecto de disminución de la excreción renal de albúmina demostrado en pacientes con diabetes mellitus, mediante la administración de otros GAG<sup>12,14,15,37-39</sup>, entre los que el más estudiado es la sulodexida.

De igual manera, el tratamiento con PPSNa protege al riñón de los cambios estructurales inducidos por la diabetes, previ-

niendo el engrosamiento de la membrana basal y la pérdida de la citoarquitectura. Esto coincide con lo comunicado por otros autores que han demostrado que la administración de heparina y otros GAG previene la nefropatía diabética en ratas manteniendo el grosor normal de la membrana basal y la densidad de cargas aniónicas, retrasando paralelamente el inicio de la microalbuminuria<sup>1-3</sup>.

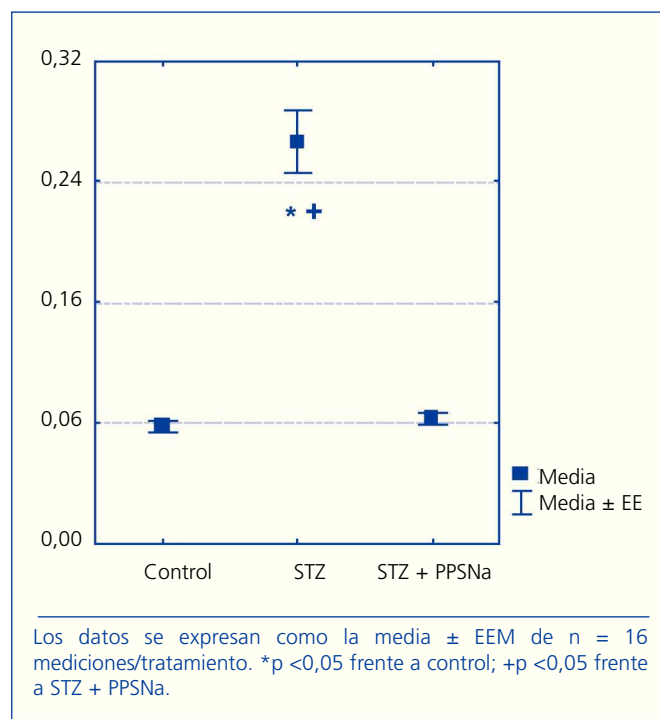
En pacientes con nefropatía diabética, se ha demostrado una correlación entre la albuminuria y el contenido de heparán sulfato de la membrana basal del glomérulo<sup>40</sup>. Asimismo, se ha observado una importante reducción de la microalbuminuria o de la macroalbuminuria en pacientes diabéticos que han sido tratados con GAG<sup>11,37-39</sup>.

Estos hallazgos señalan que los GAG pueden cumplir un papel importante en la fisiopatología de la nefropatía diabética, y que un metabolismo anormal de los GAG podría ser la causa de esta patología<sup>1,41</sup>.

El mecanismo por el cual los GAG ejercen este efecto protector en la nefropatía diabética no está completamente dilucidado. Inicialmente se propuso que su efecto se limitaría a restituir la permselectividad glomerular al reponer las cargas negativas, disminuyendo de esta forma la excreción de albúmina en orina y recuperando la funcionalidad<sup>3,32,42</sup>. Sin embargo, actualmente se sabe que los GAG pueden modular la síntesis proteica en la matriz extracelular, efecto que puede contribuir a su utilidad terapéutica.

La administración de heparina de bajo peso molecular y de dermatán sulfato previene el engrosamiento de la membrana basal, la reducción de cargas aniónicas y el inicio de la albuminuria en ratas con diabetes inducida mediante la administración de STZ<sup>1</sup>. Además, se ha demostrado que la administración de la heparina disminuye la sobreexpresión de colágeno, posiblemente interfiriendo la vía mediada por el TGFβ1 que está activada en la nefropatía diabética<sup>2,7</sup>. Recientemente Lewis y Xu (2008) han demostrado que los GAG inhiben la enzima heparanasa, que es estimulada por la hiperglicemia, previniendo de esta manera la degradación del heparán sulfato<sup>31</sup>. En conjunto, estos efectos contribuyen a que los GAG puedan prevenir las alteraciones estructurales y funcionales, principalmente mesangiales, que se presentan en la nefropatía diabética.

El PPSNa ha demostrado, en ratas nefrectomizadas, que es capaz de prevenir la atrofia de las células epiteliales y disminuir el infiltrado inflamatorio en el intersticio<sup>43</sup>, y que inhibe la proliferación de la matriz extracelular, disminuyendo el colágeno tipos I y IV en cultivo de células mesangiales<sup>44</sup>, y en células de músculo liso vascular obtenidas de pacientes en los que ha fallado el implante para obtener el acceso vascular para la hemodiálisis<sup>45</sup>. Además, reduce la nefropatía inducida por ciclosporina en ratas sometidas a depleción de sal, lo que se evidencia por la disminución del número de arteriolas



**Figura 3.** Diámetro de la membrana basal.

afectadas y de las lesiones túbulo-intersticiales<sup>46</sup>. Estos hallazgos, conjuntamente con nuestros resultados, evidencian el papel nefroprotector del PPSNa.

La similitud de efectos del PPSNa con la sulodexida, a saber, efecto fibrinolítico y activación la lipoproteína lipasa y la lipasa de triglicéridos hepática<sup>19-22</sup>, así como la similitud estructural con los GAG, pueden explicar nuestros hallazgos. Asimismo, la acción antiinflamatoria del PPSNa desempeña un papel en su efectividad para el tratamiento de la cistitis intersticial<sup>47,48</sup>, y podría participar en el efecto nefroprotector. Así, en modelos de de ratas nefrectomizadas, el efecto nefroprotector del PPSNa evidenciado por la disminución de la esclerosis y la dilatación tubular se asocia con la reducción en el infiltrado de linfocitos y macrófagos, de manera similar a los efectos referidos para el losartán<sup>43,49</sup>.

En este modelo experimental de nefropatía diabética se demuestra que el PPSNa previene parcialmente el daño renal, observándose concordancia entre los hallazgos fisiológicos y ultraestructurales, lo que sugiere un potencial uso terapéutico de este compuesto.

### Agradecimientos

Al personal del Bioterio de la Escuela José María Vargas, Laboratorios CLINIFAR, al Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Escuela de Medicina José María Vargas y a Laboratorios IVAX por la donación del pentosán polisulfato de sodio. Este trabajo fue subvencionado por el proyecto N.º PG09-11-5102-2003 y PG0911-5102-2007 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gambaro G, Cavazzana A, Luzi P, Piccoli A, Borsatti A, Crepaldi G, et al. Glycosaminoglycans prevents morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 1992;42:285-91.
- Gambaro G, Venturini A, Noonam D, Fries W, Re G, Garbisa S, et al. Treatment with a glycosaminoglycans formulation ameliorates experimental diabetic nephropaty. *Kidney Int* 1994;46:797-806.
- Gambaro G, Van der Woude F. Glycosaminoglycans: use in treatment of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:359-68.
- Kristová V, Kriska M, Babál P, Djibril MN, Slámová J, Kurtansky A. Evaluation of endothelium-protective effects of drugs in experimental models of endothelial damage. *Physiol Res* 2000;49(1):123-8.
- Koblik T, Sieradzki J, Sendur R, Biernat J, Czarnobilski K, Gryz E, et al. The effect of insulin and sulodexide (Vessel Due F) on diabetic foot syndrome: pilot study in the elderly patients. *J Diabetes Complications* 2001;15(2):69-74.
- Gluhovschi G, Schiller A, Raica M, Petrica L, Trandafirescu V, Velciov S, et al. The effects of the therapy with natural glycosaminoglycans (Sulodexide) on proteinuria in different types of glomerulonephritis. *Facta Universitatis, Medicine and Biology* 2001;8(1):26-30.
- Ceol M, Gambaro G, Sauer U, Baggio B, Anglani F, Fiorino M, et al. Glycosaminoglycans therapy prevents TGF- $\beta$ 1 overexpression and pathologic changes in renal tissue of long-term diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2324-36.
- Yard B, Chorianopoulos E, Herr D, Van der Woude F. Regulation of endothelin-1 and transforming grow factor- $\beta$ 1 production in culture proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1769-75.
- Boarder W. Natural inhibitor of transforming growht factor  $\beta$  protects against scarring in experimental kidney diseases. *Nature (Lond)* 1992;360:361-4.
- Van der Pijl J, Lemkes H, Frölich M, Van der Woude F, Van der Meer F, Van Es L. Effect of danaparoid sodium on proteinuria, von Willebrand factor, and hard exudates in patients with diabetes mellitus type 2. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1331-6.
- Solini A, Carraro A, Barzon I, Crepaldi G. Therapy with glycosaminoglycans lower albumin excretion rate in non-insulin dependent diabetic patients with macroalbuminuria. *Diab Nutr Metab* 1994;7:304-7.
- Solini A, Vergnani L, Ricci F, Crepaldi G. Glycosaminoglycans delay the progression of nephropathy in NIDDM. *Diabetes Care* 1997;20(5):819-23.
- Dedov I, Shestakova M, Vorontzov A, Palazzini E. A randomized, controlled study of sulodexide therapy for the treatment of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2295-300.
- Gambaro G, Kinalska I, Oksa A, Pont'uch P, Hertlová M, Olsovsky J, et al. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S randomized trial. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(6):1615-25.
- Achour A, Kacem M, Dibej K, Skhiri H, Bouraoui S, El May M. One year course of oral sulodexide in the management of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 2005;18(5):568-74.
- Fisher A, Merton R, Marsh Ngaffney P, Barrowcliffe T, Thomas D. A comparison of pentosan polysulfate and heparin II: effect of subcutaneous injection. *Thromb Haemostas* 1982;47:109-13.
- Daha LK, Lazar D, Simak R, Pflüger H. The effects of intravesical pentosan polysulfate treatment on the symptoms of patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis: preliminary results. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2008;19(7):987-90.
- Davis EL, El Khoudary SR, Talbott EO, Davis J, Regan LJ. Safety and efficacy of the use of intravesical and oral pentosan polysulfate sodium for interstitial cystitis: a randomized double-blind clinical trial. *J Urol* 2008;179(1):177-85.
- Bonanno G, Bonaccorso R, Dell'Áli C, Salantri G. Sulodexide in the treatment of atherosclerosis: A controlled clinical trial. *Acta Therapeutica* 1985;11:87-98.
- Marsh N, Peyser P, Creighton L, Mahmoud M, Gaffney P. The experimental pentosan polysulphate (SP54) on the fibrinolytic enzyme system-a human volunteer and experimental animal study. *Thromb Haemost* 1985;54(4):833-7.
- Mac Gregor I, Dawes J, Pepper D, Prowse C, Stocks J. Metabolism of sodium pentosan polysulphate in man measured by a new competitive binding assay for sulphated polysaccharides-

- comparison with effects upon anticoagulant activity, lipolysis and platelet alpha-granule protein. *Throm Haemost* 1985;53(3):411-4.
22. Ceriello A, Quatraro A, Ettore M, Marchi E, Barbanti M, Giugliano D. Glucosaminoglycans administration decreases high fibrinogen plasma levels in diabetic patients. *Diab Nutr Metab* 1993;6(3):1-4.
  23. Czubayko F, Smith R, Chung H, Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 1994;269(45):28243-8.
  24. Odland B, Dencker L, Tengblad A. Preferential localization of 3H-pentosanpolysulphate to the urinary tract in rats. *Pharmacol Toxicol* 1987;61(3):162-6.
  25. NIH Guide for the care and use of laboratory animals. *NIH Guide* 1996;25(28):1-111.
  26. Sobin S. Accuracy of indirect determination of blood pressure in rat: relation to temperature of plethysmograph and width of cuff. *Am J Physiol* 1983;146:179-82.
  27. Gallagher J, Lyon M, Steward W. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J* 1986;236:313-25.
  28. Wu V, Wilson B, Cohen M. Disturbances in glomerular basement membrane glycosaminoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1987;36:679-83.
  29. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria: Implications for micro- and macrovascular diseases. *Diabetes Care* 1992;15(9):1181-91.
  30. Jensen T. Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. *Diabetes* 1997;46(S2):S98-S100.
  31. Lewis E, Xu X. Abnormal glomerular permeability characteristic in diabetic nephropathy. Implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin. *Diabetes Care* 2008;31(S2):S202-S206.
  32. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Vidal P, Norgaard K, Andreassen HB, Felt-Rasmussen B. Size and charge selectivity of glomerular filtration in type 1 (insulin-dependent) diabetes with and without albuminuria. *Diabetologia* 1993;36:244-51.
  33. Kanwar Y, Rosenzweig L, Linker A, Jakubowski M. Decreased the novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographic evidences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2272-5.
  34. Rohrbach D, Hassel J, Kleinman H, Martín G. Alterations in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 1982;31:185-8.
  35. Parthasarathy N, Spiro R. Effect of diabetes on the glycosaminoglycans component of the human glomerular basement membrane. *Diabetes* 1982;31:738-41.
  36. Wasty F, Alavi MZ, Moore S. Distribution of glycosaminoglycans in the intima of human aortas: changes in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993;36(4):316-22.
  37. Myrup B, Hansen P, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A, Feldt-Rasmussen B, Gram J, et al. Effect of low-dose of heparin on urinary excretion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1995;345:421-2.
  38. Tamsma J, Van der Woude Y, Lemkes H. Effect of sulphated glycosaminoglycans on albuminuria in patients with overt diabetic (type 1) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11(1):182-5.
  39. Velussi M, Cernigoi A, Dapas F, De Monte A. Glycosaminoglycans oral therapy reduces microalbuminuria, blood fibrinogen levels and limb arteriopathy clinical signs in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Nutr Metab* 1996;9:53-8.
  40. Tamsma J, Van der Born J, Brujin J, Assmann K, Weening J, Berden J, et al. Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. *Diabetologia* 1994;37:313-20.
  41. Gambaro G, Baggio B. Glycosaminoglycans: a new paradigm in the prevention of proteinuria and progression of glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:762-4.
  42. Gambaro G, Skrha J, Ceriello A. Glycosaminoglycans therapy for the long-term diabetic complications. *Diabetologia* 1998;41:975-9.
  43. Bobadilla NA, Tack I, Tapia E, Sánchez-Lozada LG, Santamaría J, Jiménez F, et al. Pentosan polysulfate prevents glomerular hypertension and structural injury despite persisting hypertension in 5/6 nephrectomy rats. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2080-7.
  44. Elliot SJ, Striker LJ, Stetler-Stevenson W, Jacot TA, Striker GE. Pentosan polysulfate decreases proliferation and net extracellular matrix production in mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:62-8.
  45. Elliot SJ, Striker LJ, Connor E, Stetler-Stevenson W, McQuinn WC, Blagg CR, et al. Pentosan polysulfate decreases proliferation and extracellular matrix deposition by vascular smooth muscle cells isolated from failed hemodialysis access grafts. *Clin Nephrol* 2000;54(2):121-7.
  46. Schwedler SB, Bobadilla N, Striker LJ, Vaamonde CA, Herrera-Acosta J, Striker GE. Pentosan polysulfate treatment reduces cyclosporine-induced nephropathy in SALT-depleted rats. *Transplantation* 1999;68(10):1583-8.
  47. Sadhukhan PC, Tchetgen MB, Rackley RR, Vasavada SP, Liou L, Bandyopadhyay SK. Sodium pentosan polysulfate reduces urothelial responses to inflammatory stimuli via an indirect mechanism. *J Urol* 2002;168(1):289-92.
  48. Chiang G, Patra P, Letourneau R, Jeudy S, Boucher W, Green M, et al. Pentosanpolysulfate inhibits mast cell histamine secretion and intracellular calcium ion levels: an alternative explanation of its beneficial effects in interstitial cystitis. *J Urol* 2000;164(6):2119-25.
  49. Herrera-Acosta J, Tapia E, Sánchez-Lozada LG, Franco M, Striker LJ, Striker GE, et al. Restoration of glomerular haemodynamics and renal injury independent of arterial hypertension in rats with subtotal renal ablation. *J Hypertension* 2002;20(S3):S29-35.