

ASSORBIMENTO, RICEZIONE E AFFINITÀ TISSUTALE DI ACIDO IALURONICO AD ALTO PESO MOLECOLARE DOPO SOMMINISTRAZIONE ORALE IN RATTI E CANI

Lo scopo del presente studio era di determinare l'assorbimento, la distribuzione e la secrezione di acido ialuronico ad alto peso molecolare etichettato tecnecio e pertecnecio di tecnecio dopo singola dose, amministrazione orale a ratti Wistar e cani Beagle.

LAJOS BALOGH,[†] ANDRAS POLYAK,[†] DOMOKOS MATHE,[†] REKA KIRALY,[†]

JULIANA THUROCZY,[†] MARIAN TEREZ,[†] GYOZO JANOKI,[†] YAOTING TING,[‡]

LUKE R. BUCCI,[§] AND ALEXANDER G. SCHAUSS*,[|]

Dipartimento di Radioisotopi Applicati, National "F.J.C." Research Institute for Radiobiology and

Radiohygiene, "Fodor Jo'zsef" National Center of Health, Budapest, Ungheria, FenChem Biotek LTD,

Nanjing, China, Schiff Nutrition Group, Salt Lake City, Utah, e Life Sciences Division, American

Institute for Biosocial and Medical Research, Inc., Puyallup, Washington.

Lo scopo del presente studio era di determinare l'assorbimento, la distribuzione e la secrezione di acido ialuronico ad alto peso molecolare etichettato tecnecio e pertecnecio di tecnecio dopo singola dose, amministrazione orale a ratti Wistar e cani Beagle. Uno studio pilota ha utilizzato solo ^{99m}Tc-HA e un secondo studio di conferma ha confrontato l'assunzione di ^{99m}Tc-HA etichettato con ^{99m}Tc-P. L'escrezione urinaria e fecale dopo l'ingestione di ^{99m}Tc-HA da parte dei ratti ha mostrato che l'86.7-95.6% di radioattività era stata recuperata quasi in tutte le feci. Tutti i tessuti esaminati hanno mostrato l'incorporazione di radioattività da ^{99m}Tc-HA con inizio a 15 minuti e persistenza per 48 ore in uno schema significativamente diverso da ^{99m}Tc-P. Immagini scintigrafiche totali e ingrandimenti della regione torso-ventrale mostravano radioattività non alimentare da ^{99m}Tc-HA concentrato nelle articolazioni, vertebre e ghiandole salivari per ore dopo la somministrazione. L'autoradiografia di frammenti di pelle, ossa e tessuti articolari dopo 24 ore mostrava l'incorporazione di radioattività da ^{99m}Tc-HA, ma non da ^{99m}Tc-P. Al contrario, l'assorbimento, distribuzione ed escrezione di ^{99m}Tc erano completamente diversi da ^{99m}Tc-HA, indicando uno schema atteso di assorbimento ed escrezione rapidi con l'urina, con accumulo nelle ghiandole tiroidee, stomaco, reni e vescica. Questa

relazione presenta la prima prova di assunzione e distribuzione ai tessuti connettivi di HA ad alto peso molecolare somministrato oralmente.

INTRODUZIONE

L'acido ialuronico (HA) è un glicosaminoglicano ad alto peso molecolare che si trova negli animali e consiste in unità di disaccaride ripetuto di N-acetilglucosamine e glucuronato (1-3). Ubiquo in tessuti animali e fluidi, l'HA si trova in grandi concentrazioni nel liquido sinoviale, umore vitreo e pelle (2). L'HA è elencato come ingrediente in moltissimi integratori dietetici mirati per la salute delle articolazioni e la pelle di animali e umani (1). Negli Stati Uniti gli integratori alimentari sono regolati come sottoinsieme di cibi dal Dietary Supplement Health & Education Act del 1994 (4). Le stime di centinaia di migliaia di dosi annue da integratori alimentari contenenti HA negli Stati Uniti mostrano come l'HA sia largamente consumato in aggiunta a quantità normalmente presenti in cibi di derivazione animale.

L'HA negli integratori alimentari deriva dall'estrazione dalla cresta delle galline o per fermentazione microbica, sebbene alcune sorgenti siano semplicemente cartilagine in polvere o cartilagine idrolizzata, che non sono ben caratterizzate rispetto al contenuto di HA e al peso molecolare (1).

Così, la maggior parte dell'HA ingerito dai consumatori è in forma ad alto peso molecolare circa 1 milione di dalton (1 MDa). Ovviamente, se si attendono effetti biologici dall'assunzione orale di HA, allora è logico valutare l'assorbimento orale nei tessuti, specialmente tessuti connettivi e pelle. Tuttavia, non troveremmo alcuna relazione nella letteratura relativamente all'assorbimento o all'assunzione di HA ad alto peso molecolare dopo somministrazione orale. L'HA tipicamente è usato come dispositivo medico per il trattamento di condizioni degenerative delle articolazioni ed è usato nella chirurgia oculistica e nella cura di ferite (1-3, 5-6).

L'HA è somministrato per iniezione o vie topiche in questi casi. A causa del grande peso molecolare e della dimensione delle molecole singole di HA (solitamente 1 MDa o superiore), e della veloce pulizia dal flusso sanguigno per mezzo del fegato (2), si è ipotizzato che l'HA orale dimostrasse scarso assorbimento e/o utilità clinica. Tuttavia, questa ipotesi non è stata provata o relazionata nella letteratura scientifica con tecniche moderne. Il presente studio ha analizzato l'assorbimento nel flusso sanguigno e nei tessuti in due modelli di animali dopo ingestione di HA ad alto peso molecolare radioattivo, simile a quello usato in alcuni integratori dietetici. Abbiamo riscontrato prove di assorbimento di HA radioattivo nei tessuti, specialmente connettivi, dopo la somministrazione orale negli animali.

MATERIALI E METODI

Test Materials. Food grade sodium hyaluronate (trade name Nutrihyl, manufactured by Bioconti spol.sr.o, Tvardkova, 1191, Usti nad Orlici, Czech Republic), containing 93.6% sodium hyaluronate, was used for the pilot study. Molecular weight was approximately 1 MDa. Food grade sodium hyaluronate (trade name HyaMax, manufactured by FenChem Biotek Ltd., Nanjing, China) was used for the controlled experiment. Molecular weight was approximately 1.1-1.5 MDa for each HA.

99mTechnetium Labeling of Hyaluronan. 99mTc-pertechnetate

(99mTc-P) was collected from a 99mMo-99mTc generator (Drygen, Sorin Biomedica) (7). Purity of the eluted TcO₄⁻ (pertechnetate) solution was over 99%. The labeling process for HA that yielded the highest efficiency was as follows: 9 mg of HA in 900 μ L of distilled water, 30 μ L of 10⁻³ M calcium glucoheptonate, 1.1 mL of 2.2 GBq 99mTc-pertechnetate solution, and 100 μ L of 1 mg/mL SnCl₂ in 1.0 M HCl, pH 4.0. This mixture was incubated at 50 °C for 90 min with gentle stirring. Two thin layer chromatograph (TLC)^o methods were used to separate the 99mTc-labeled HA (99mTc-HA) from free pertechnetate and labelled tin colloid and deduce labeling efficiency: TLC (0.2 mm silica gel 60 on aluminum sheets, Merck Inc.) developed in acetone for determining the free pertechnetate impurity and ITLC-SG (silica gel impregnated glass fiber sheets, Gelman Sciences Inc.) developed in 0.9% NaCl solution for determining tin colloid impurity. In vitro stability of 99mTc-HA was checked by the same methods after 6, 24, and 48 h incubation in physiological saline, canine blood sera and canine synovial fluids as mediums at room temperature.

Urinary and Fecal Excretion in Rats.

A single dose of 99mTc-HA (100 MBq/0.2 mg/0.2 mL) or 99mTc-P (100 MBq/0.2 mL) was administered per os via a Teflon feeding tube to five Wistar rats weighing between 150 and 200 g in each study. 99mTc agents were administered within one hour after finishing the labeling process. Rats were held in individual metabolism cages for separate collection of urine and feces at 12, 24, 48 and 72 h post administration. Radioactivity collected from urine and feces was reported as the percentage of applied dose (mean (SD from five animals). Animals were maintained and handled according to the Declaration of Helsinki guidelines.

Blood and Urinary Clearance in Dogs. A single dose of 99mTc-HA (370 MBq/10 mg/1.5 mL) or 99mTc-P (370 MBq/1.5 mL) was administered per os via a Teflon feeding tube to two Beagle dogs weighing 10-15 kg in each study. Blood and urine samples were collected at multiple time points after administration, including 2, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h after administration. Results were reported as the percent of administered dose/gram of whole blood or urine. Fitted time activity curves were plotted to assess blood and urine clearance over time.

Tissue Distribution Assay in Rats. A single dose of 99mTc-HA (100 MBq/0.2 mg/0.2 mL) or 99mTc-P (100 MBq/0.2 mL) was administered via feeding tube per os to Wistar rats weighing 150-200 g in both studies. Three animals per time point were euthanized at each of the following times after administration of the labeled compound: 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h. For time points of 48 and 72 h, 2000 MBq/0.2 mL was administered.

Radioactivity in the following organs and tissues was counted in both studies: blood, bone, heart, large intestine (two sections), liver (two pieces), lungs, kidneys, muscle, small intestines (two sections), spleen, stomach and urinary bladder in both studies and additionally, brain, complete knee joint, skin and thyroids in the controlled study. Percentages of applied dose/whole organ and applied dose/gram tissue were calculated as mean (SD. After removal of other organs and tissues, carcass radioactivity was

measured, and this data was used to calculate radioactivity, assuming the following percentages of body weight in blood (6.5%), bone (10.8%) and muscles (45%).

Scintigraphic Examinations of Animals.

In the pilot study, early, middle and late static pictures (whole body and zoomed pictures from different regions of the body) were taken 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h after oral administration of ^{99m}Tc-HA to assess its absorption, distribution and excretion in two Wistar rats and a Beagle dog with a Nucline x-ring gamma camera (8). In the controlled study, early, middle and late static pictures were taken 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, and 48 h after oral application of labeled compounds in four Wistar rats. Dorsoventral and lateral whole body views were taken at each time point for each agent for each study.

SPECT/CT Scans of Rats.

In the controlled study, supersensitive nanoSPECT/CT scans were taken in rats to image and localize biodistribution of radioactivity in the whole body, and to determine the presence or absence of radioactivity in ex vivo samples of bone, joints and skin (Nano SPECT/CT, Bioscan Ltd.). Hybrid images of whole body, three-dimensional lateral views and sagittal, coronal and tranverse slices (through areas of high radioactivity as shown by the three-dimensional image) were imaged from 0.5-48 h, showing the skeleton and ghost images of the rest of the body with radioactivity superimposed in color. In addition, transverse slice images of joints were also imaged at 48 h. Semiquantitative biodistribution analysis via ROI-data calculations was performed to measure bioutilization of ^{99m}Tc- HA in rats.

Autoradiography of Rat Tissue Samples.

In the controlled study, a single dose of ^{99m}Tc-HA (100 MBq/0.2 mg/0.2 mL) or ^{99m}Tc-P (100 MBq/0.2 mL) was administered per os via a Teflon feeding tube to four Wistar rats weighing 150-200 g. Animals were sacrificed 24 and 48 h after administration and parallel samples of complete femurs, forelegs, hind legs, tails and skin were removed and contact microautoradiography and scintigraphy performed.

Statistical Analysis.

Comparisons of the percentage of ingested dose in tissues between the ^{99m}Tc-P and ^{99m}Tc-HA (HyaMax) groups were determined by ANOVA (SPSS ver 12.0). Other statistical analyses were performed with GraphPad Prism Version 5.01 or GraphPad InStat 3 software.

RISULTATI

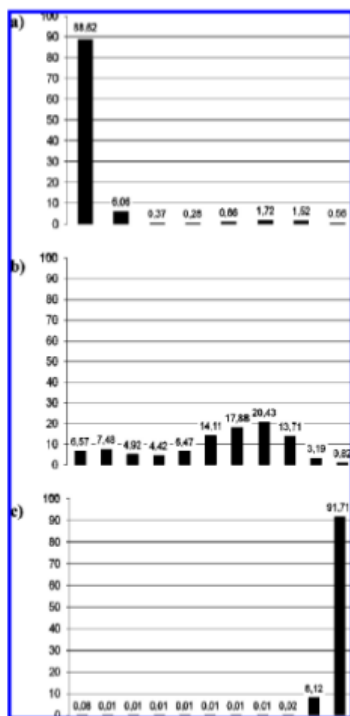


Figura 1. Separazione Cromatografica di ^{99m}Tc -labeled Hyaluronate (^{99m}Tc -HA) e marcatura ^{99m}Tc -pertechnetate (^{99m}Tc). (a) TLC di ^{99m}Tc -HA sviluppato in acetone; (b) ITLC di ^{99m}Tc -HA sviluppato in soluzione salina fisiologica; e (c) TLC di ^{99m}Tc sviluppato in acetone. Asse-X: numero frazionario arbitrario. Asse-Y: % di radioattività applicata.

Purezza, efficacia e stabilità della marcatura. La purezza della soluzione $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetato) diluita è sempre stata almeno del 99%. I risultati delle analisi cromatografiche hanno mostrato che l'efficacia di marcatura era superiore all'85% in entrambi gli studi. Il pertechnetato libero nelle preparazioni ^{99m}Tc -HA è sempre stato inferiore al 3% di radioattività e lo stagno colloidale aveva meno del 7% di radioattività nel ^{99m}Tc -HA (**Figura 1**). La marcatura si è dimostrata stabile entro 48 ore dalla marcatura quando conservata in soluzione salina, siero canino e fluido sinoviale canino (dati non indicati).

TAB 1.Escrezione urinaria e fecale di ^{99m}Tc -Hyaluronan e ^{99m}Tc -Pertechnetate nei ratti (in % della dose ingerita $\pm$ SD)

Gruppi	Ore	feci	urine	totali
Nutrihyl ^{99m}Tc -HA	0-12		2.1 $\pm$ 1.3	0.40
	$\pm$ 0.17			
	2.5 $\pm$ 1.3			
		0-24		39.5 $\pm$ 11.7
	1.3 $\pm$ 0.38	40.7 $\pm$ 13.2		
HyaMax ^{99m}Tc -HA	0-12		1.8 $\pm$ 1.6	0.34 $\pm$
	0.11			
	2.2 $\pm$ 1.6			
		0-24		42.2 $\pm$ 9.5
	0.78 $\pm$ 0.18	42.9 $\pm$ 9.4		
^{99m}Tc -pertechnetate	0-12			
	66.2 $\pm$ 3.7			
		0-24		0.64 $\pm$ 0.09
	82.4 $\pm$ 4.7	83.1 $\pm$ 4.7		
		0-48		
			0.88 $\pm$ 0.08	89.0 $\pm$ 4.2
	89.8 $\pm$ 4.2			
		0-72		1.2 $\pm$ 0.09
	93.2 $\pm$ 4.4	94.4 $\pm$ 4.5		

Escrezione fecale e urinaria nei ratti. Nello studio pilota le escrezioni medie totali di Nutrihyl ^{99m}Tc -HA nelle 72 h erano 92.3 $\pm$ 1.7% della dose ingerita nelle feci e 3.2 $\pm$ 0.42% della dose ingerita nelle urine, per un'escrezione totale urina + feci del 95.6 $\pm$ 2.0% della dose ingerita (**Tabella 1**). Nello studio confirmatorio, le escrezioni medie totale di HyaMax ^{99m}Tc -HA nelle 72 ore erano 84.6 $\pm$ 7.8% della dose ingerita nelle feci e 2.0 $\pm$ 0.63% della dose ingerita nelle urine, per un'escrezione totale urina + feci dell'86.7 $\pm$ 8.0% della dose ingerita. Le escrezioni medie totali di ^{99m}Tc nelle 72 ore erano 1.2 $\pm$ 0.09% della dose ingerita nelle feci e 93.2 $\pm$ 4.5% della dose ingerita nelle urine, per un'escrezione totale urina + feci del 94.4 $\pm$ 4.5% della dose ingerita. La somiglianza dello schema di escrezione per i due gruppi ^{99m}Tc -HA è in netto contrasto con lo schema per ^{99m}Tc -P. Entrambi i gruppi ^{99m}Tc -HA mostravano escrezione di quasi tutta la radioattività nelle feci dopo 24 h, in coincidenza con il tempo di transito intestinale e verificato con la scintigrafia a corpo intero. Tuttavia, il gruppo ^{99m}Tc -P ha escreto quasi tutta la radioattività nell'urina e non nelle feci. Questo schema di escrezione per ^{99m}Tc -P è tipico e noto.

Indice di depurazione sanguigno e urinario nei cani. Nello studio pilota, la somministrazione di una dose singola di ^{99m}Tc -HA a cani Beagle ha mostrato un indice di depurazione del sangue di 0.05%/g di sangue tra 2-4 h post-somministrazione (**Tabella 2**). La curva di indice di depurazione del sangue ha mostrato un netto aumento nelle prime due ore, con ferma diminuzione nelle successive 72 h. Nello studio controllato, l'indice di depurazione del sangue è aumentato immediatamente per tornare al background entro 6 h.

L'indice di depurazione sanguigno di ^{99m}Tc è iniziato a 15 min, ha raggiunto un picco dopo 2 - 4 ore e quindi è ricaduto dopo 48 h.

Nello studio pilota, l'indice di depurazione urinario nei cani Beagle ha raggiunto il picco a 0.70%/g di urina 48 h dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -HA (**Tabella 2**). La curva di indice di depurazione urinario ha mostrato un aumento progressivo nell'indice di depurazione verso un picco a 48 h, seguito da una diminuzione nelle successive 24 h fino a 0.20%/g di urina alle 72 h. Nello studio controllato, l'indice di depurazione urinario di ^{99m}Tc -HA è apparso anche dopo 0.5 h, ma è tornato a livello di background dopo 12 h. L'indice di depurazione urinario di ^{99m}Tc -P è iniziato a 0.5 h e proseguito fino a 72 h.

Confrontando gli schemi di indice di depurazione di ^{99m}Tc -P con ^{99m}Tc -HA, sono emerse chiare differenze tra i due nello studio confirmatorio. I dati provenienti da ^{99m}Tc -HA nello studio pilota sono apparsi simili allo schema di controllo ^{99m}Tc -P. Tuttavia, la differenza tra l'escrezione urinaria e fecale era simile per entrambi i gruppi HA e diametralmente opposti allo schema di controllo ^{99m}Tc -P.

Biodistribuzione della radioattività nei tessuti. Tre ratti Wistar sono stati sacrificati a ciascuno dei 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 h dopo la somministrazione di agenti ed è stata rilevata la radioattività in sangue, ossa, cervello, cuore, reni, articolazioni del ginocchio, due sezioni dell'intestino crasso, due sezioni del fegato, polmone, muscolo, due sezioni dell'intestino tenue, pelle, milza, stomaco, tiroide e vescica urinaria esprimendo i valori in percentuale della dose ingerita per organo (**Tabella 3**). I tessuti di cervello, articolazione del ginocchio, pelle e tiroide non sono stati misurati nello studio pilota (gruppo Nutrihyl).

Gli schemi di distribuzione della radioattività nei tessuti tra i gruppi ^{99m}Tc -P e ^{99m}Tc -HA (caratterizzati da rapporti tra i tessuti a ogni intervallo) si sono mostrati subito diversi restando diversi per tutta la durata degli studi. La somministrazione di ^{99m}Tc -P ha mostrato uno schema caratteristico di rimozione rapida della radioattività dal tratto gastrointestinale (meno di due ore), assorbimento rapido e rimozione dalla maggior parte dei tessuti a bassi livelli (entro due ore), con successiva residua radioattività in tiroide, reni e vescica urinaria. La perdita di radioattività dal corpo dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -P è stata più rapida

rispetto a entrambi i gruppi $^{99m}\text{Tc-HA}$, come indicato dalla radioattività totale nei tessuti per intervallo. Dopo 72 h, solo lo 0.5% della dose ingerita per $^{99m}\text{Tc-P}$ stata recuperata dai tessuti, in linea con il recupero in urine e feci di cui alla **Tabella 1**. L'analisi ANOVA della radioattività totale (fecale e urinaria) escreta per ogni intervallo ha riscontrato differenze significative tra i gruppi ($P < 0.0001$ per 0-12 e 0-24 h, $P = 0.0099$ per 0-48 h, $P = 0.0487$ per 0-72 h).

In contrasto, lo schema di distribuzione della radioattività mostrato da entrambi i gruppi $^{99m}\text{Tc-HA}$ era notevolmente diversa dal gruppo $^{99m}\text{Tc-P}$ e simile a

ciascuno degli altri. L'intervallo tra lo studio pilota e lo studio controllato è stato di quattro anni, suggerendo effetti biologici riproducibili dopo la somministrazione orale di $^{99m}\text{Tc-HA}$. È stato chiaro che la maggioranza di

$^{99m}\text{Tc-HA}$ somministrato oralmente è rimasto nel tratto gastrointestinale, come indicato dalla localizzazione della radioattività nel primo stomaco, quindi in segmenti di intestino tenue, segmenti di intestino crasso nel rispettare normali tempi di transito intestinale per i ratti.

La radioattività dopo la somministrazione di $^{99m}\text{Tc-HA}$ ha mostrato accumulo in sangue, ossa, articolazioni del ginocchio, tessuti muscolari ed epidermici, ma non in altri organi. È interessante notare un assorbimento molto rapido della radioattività in ossa, tessuti muscolari e dell'intestino crasso e tenue a 5 e 15 min, sebbene il bolo $^{99m}\text{Tc-HA}$ chiaramente non fosse ancora nei segmenti intestinali (come indicato dai dati scintigrafici). L'assorbimento rapido della radioattività in questi tessuti non è stato visto per il gruppo $^{99m}\text{Tc-P}$ a questi intervalli e questo indica l'assenza di assorbimento a causa di possibile $^{99m}\text{Tc-P}$ libero e contaminante. In seguito, l'assorbimento tissutale di radioattività in sangue e tessuti periferici ha coinciso con la presenza di $^{99m}\text{Tc-HA}$ in sezioni assorbenti del tratto gastrointestinale. Dopo 72 h, il 10.0% della radioattività ingerita restava nei tessuti, in stretta corrispondenza con il valore del 13.3% escreto di cui alla **Tabella 1**.

Tabella 2. Depurazione sanguigna e urinaria dopo somministrazione orale di ^{99m}Tc -Hyaluronan (^{99m}Tc -HA) o ^{99m}Tc -Pertechnetate cani Beagle (% della dose ingerita /Grammi di fluido).

Gruppi	Fluido	Tempo (h)										
		0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	12	24	48	72
Nutrihyl ^{99m}Tc -HA	sangue	0.00			0.01	0.01			0.02	0.05	0.05	
0.01 0.01	urine	0.02	0.00			0.07		0.05	0.03	0.02	0.05	
0.10 0.30		0.70	0.20									
HyaMax ^{99m}Tc -HA	sangue	0.06		0.06		0.02		0.04	0.02	0.01	0.01	
0.00 0.00	urine	0.00		0.00		0.30		0.07	0.11	0.09	0.12	
0.02 0.00		0.00	0.00									
^{99m}Tc -pertechnetate	sangue	0.00		0.01	0.02			0.03	0.06	0.05	0.03	
0.02 0.03	urine	0.01		0.00	0.06			0.06	0.04	0.03	0.05	
0.03 0.02		0.08	0.03									

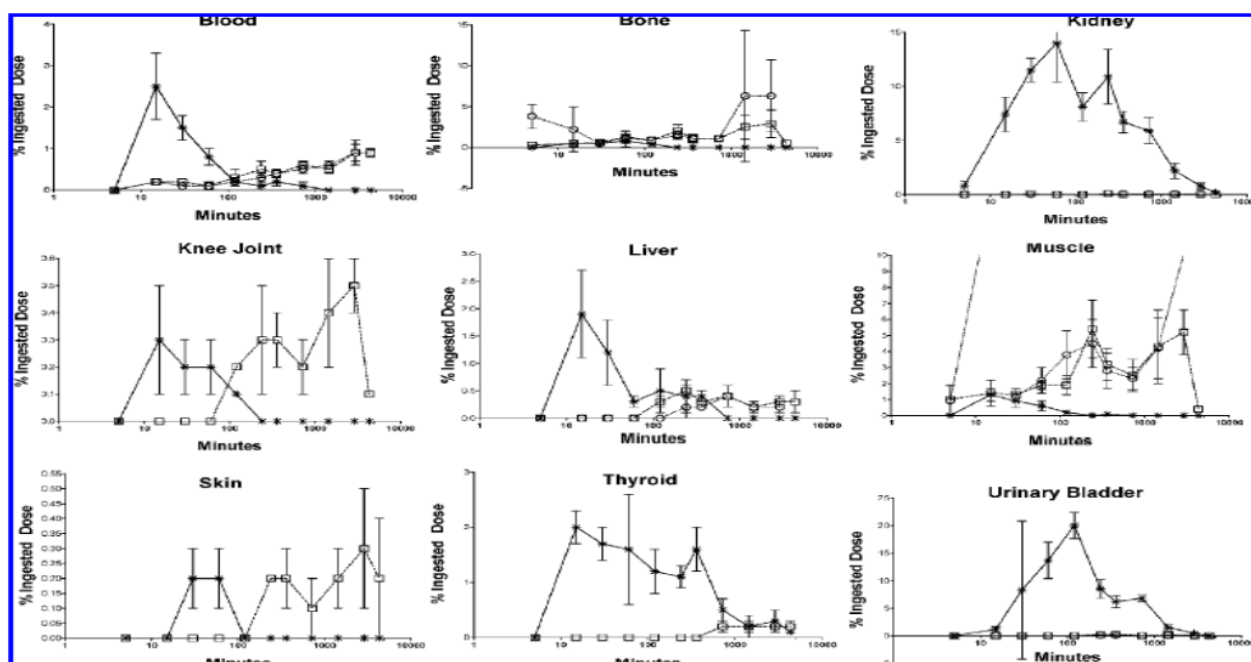


Figura 2. Radioattività (% della dose ingerita $\pm$ SD) nei tessuti selezionati dei ratti, confrontando l'assorbimento tra ^{99m}Tc -pertechnetate (*) e ^{99m}Tc -hyaluronans ($\square$ per HyaMax, $\circ$ per NutriHyl) in un periodo di 72 h. Tre ratti per intervalli. Le scale asse-Y sono state regolate e il tempo indicato con scale logaritmica per una migliore visualizzazione, specialmente 0-12 h. Gli intervalli erano 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 720, 1440, 2880 e 4320 min dopo la somministrazione.

La figura 2 mostra l'assorbimento di radioattività nei tessuti selezionati come funzione di tempo, permettendo un confronto visuale tra i gruppi ^{99m}Tc -P e ^{99m}Tc -HA. Le scale di radioattività (asse y) sono state regolate e stampate come funzione temporale (asse x) su una scala logaritmica per una visualizzazione migliore. In generale, è evidente uno schema comune per sangue, ossa, articolazione del ginocchio, fegato, muscolo e pelle. Questi tessuti hanno mostrato assorbimento di radioattività da ^{99m}Tc -P tra 0 e 2 h, e assorbimento minimo o assente in seguito. Tuttavia, questi tessuti hanno mostrato assorbimento di radioattività dopo ^{99m}Tc -HA da 2 h in avanti, solitamente con accumulo in momenti successivi (24-72 h). Rene, tiroide, vescica urinaria mostravano uno schema molto diverso, con assorbimento di radioattività da ^{99m}Tc -P persistente per 0-12 h e oltre, mentre l'assorbimento dopo ^{99m}Tc -HA era nullo o solo in tracce.

L'intestino crasso e tenue (non indicati) hanno mostrato radioattività scarsa o non apprezzabile dopo il passaggio di $^{99m}\text{Tc-P}$ nello stomaco. Dopo il $^{99m}\text{Tc-HA}$, questi tessuti mostravano la maggior parte di radioattività ingerita in uno schema in linea con il normale tempo di transito intestinale.

Infatti, nei momenti appropriati, la radioattività è stata notata nelle feci formate nella parte terminale dell'intestino crasso e del retto, come indicato dagli esiti scintigrafici (non mostrati). I restanti tessuti (cervello, cuore, polmoni e milza) hanno mostrato solo quantità minime di radioattività dopo $^{99m}\text{Tc-P}$ da 0 A 2 h, e nessuna radioattività dopo $^{99m}\text{Tc-HA}$.

Tabella 3. Biodistribuzione di radioattività nei tessuti indicata come % della dose ingerita dopo la somministrazione orale di ^{99m}Tc -Pertechnetate (^{99m}Tc) e ^{99m}Tc -Hyaluronan (^{99m}Tc -HA) da ciascuno studio (media $\pm$ SD) ratti Wistar ($n = 3$ intervallo)

tessuti	^{99m}Tc -HA			tessuti	^{99m}Tc -HA		
	^{99m}Tc	HyaMax	Nutrilhyl		^{99m}Tc	HyaMax	Nutrilhyl
5 min				60 min			
sangue	ND	ND	ND	sangue	0.8 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1
osso	ND	0.3 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 1.5	osso	0.8 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.6
cervello	ND	ND	NA	cervello	0.1 $\pm$ 0.0	ND	NA
cuore	ND	ND	ND	cuore	0.2 $\pm$ 0.1	ND	ND
rene	0.8 $\pm$ 0.4	ND	ND	rene	14.0 $\pm$ 3.6	ND	ND
ginocchio	ND	ND	NA	ginocchio	0.2 $\pm$ 0.1	ND	NA
intestino grande (1)	ND	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	intestino grande	0.7 $\pm$ 0.2	ND	ND
intestino grande (2)	ND	0.1	0.1 $\pm$ 0.0	intestino grande (2)	0.1 $\pm$ 0.0	ND	ND
fegato (1)	ND	ND	ND	fegato (1)	0.2 $\pm$ 0.1	ND	ND
fegato (2)	ND	ND	ND	fegato (2)	0.1 $\pm$ 0.0	ND	ND
polmone	ND	ND	0.1 $\pm$ 0.0	polmone	0.2 $\pm$ 0.1	ND	ND
muscolo	ND	1.0 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.9	muscolo	0.6 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.8
pelle	ND	ND	NA	pelle	0.2 $\pm$ 0.1	ND	NA
intestino piccolo (1)	ND	6.3 $\pm$ 2.6	11.5 $\pm$ 12.0	intestino piccolo (1)	1.3 $\pm$ 0.9	23.3 $\pm$ 20.1	18.9 $\pm$ 16.4
intestino piccolo (2)	ND	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.5	intestino piccolo (2)	1.3 $\pm$ 0.3	23.3 $\pm$ 19.2	29.7 $\pm$ 32.0
milza	0.5 $\pm$ 0.2	ND	ND	milza	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
stomaco	91.9 $\pm$ 5.0	82.6 $\pm$ 2.4	80.8 $\pm$ 12.0	stomaco	28.4 $\pm$ 4.8	45.0 $\pm$ 4.2	32.6 $\pm$ 28.3
tiroide	ND	ND	NA	tiroide	1.6 $\pm$ 1.0	ND	NA
vescica urinaria	ND	ND	ND	vescica urinaria	13.7 $\pm$ 3.3	ND	ND
totali	93.2 $\pm$ 5.5	90.8 $\pm$ 0.6	97.9 $\pm$ 1.8	totali	65.4 $\pm$ 6.7	94.9 $\pm$ 4.0	85.0 $\pm$ 13.3
15 min				120 min			
sangue	2.5 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	sangue	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.0
osso	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 2.7	osso	0.4 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1
cervello	ND	ND	NA	cervello	0.2 $\pm$ 0.1	ND	NA
cuore	0.3 $\pm$ 0.2	ND	ND	cuore	0.1 $\pm$ 0.0	ND	ND
rene	7.4 $\pm$ 1.6	ND	ND	rene	8.1 $\pm$ 1.3	ND	ND
ginocchio	0.3 $\pm$ 0.2	ND	NA	ginocchio	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	NA
intestino grande (1)	0.5 $\pm$ 0.2	0.7	0.3 $\pm$ 0.4	intestino grande (1)	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	ND
intestino grande (2)	ND	0.3	0.1 $\pm$ 0.1	intestino grande (2)	0.1 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 3.6	2.0 $\pm$ 1.9
fegato (1)	0.8 $\pm$ 0.4	ND	ND	fegato (1)	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.1	ND
fegato (2)	1.1 $\pm$ 0.4	ND	ND	fegato (2)	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	ND
polmone	1.2 $\pm$ 0.4	ND	0.1 $\pm$ 0.0	polmone	0.1 $\pm$ 0.1	ND	ND
muscolo	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.8	13.5 $\pm$ 20.2	muscolo	0.2 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 1.5
pelle	ND	ND	NA	pelle	ND	ND	NA
intestino piccolo (1)	6.2 $\pm$ 0.4	20.7 $\pm$ 8.7	26.3 $\pm$ 12.3	intestino piccolo (1)	0.9 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 21.7	36.7 $\pm$ 25.8
intestino piccolo (2)	2.2 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 0.8	7.9 $\pm$ 1.4	intestino piccolo (2)	0.3 $\pm$ 0.2	17.3 $\pm$ 21.8	12.9 $\pm$ 11.0
milza	0.3 $\pm$ 0.1	ND	ND	milza	ND	ND	ND
stomaco	62.0 $\pm$ 1.6	57.8 $\pm$ 5.7	51.1 $\pm$ 15.1	stomaco	23.4 $\pm$ 3.4	45.1 $\pm$ 12.3	39.0 $\pm$ 12.5
tiroide	2.0 $\pm$ 0.3	ND	NA	tiroide	1.2 $\pm$ 0.4	ND	NA
vescica urinaria	1.2 $\pm$ 0.6	ND	ND	vescica urinaria	20.0 $\pm$ 2.4	ND	ND
totali	89.3 $\pm$ 0.7	88.1 $\pm$ 9.3	98.9 $\pm$ 0.5	totali	55.5 $\pm$ 4.1	94.3 $\pm$ 3.5	95.7 $\pm$ 3.3
30 min							
sangue	1.5 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0				
osso	0.5 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2				
cervello	0.1 $\pm$ 0.0	ND	NA				
cuore	0.3 $\pm$ 0.3	ND	ND				
rene	11.5	0.1	ND				
ginocchio	0.2 $\pm$ 0.1	ND	NA				
intestino grande (1)	0.9 $\pm$ 0.3	0.2	0.1 $\pm$ 0.1				
intestino grande (2)	1.1 $\pm$ 0.1	ND	ND				
fegato (1)	0.7 $\pm$ 0.3	ND	ND				
fegato (2)	0.5 $\pm$ 0.3	ND	ND				
polmone	ND	ND	ND				
muscolo	0.9 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3				
pelle	0.2 $\pm$ 0.1	ND	NA				
intestino piccolo (1)	5.4 $\pm$ 0.6	18.4 $\pm$ 11.7	28.3 $\pm$ 20.9				
intestino piccolo (2)	4.3 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 12.0	9.1 $\pm$ 7.9				
milza	0.2 $\pm$ 0.1	ND	ND				
stomaco	42.8 $\pm$ 4.9	67.5 $\pm$ 4.2	58.4 $\pm$ 16.8				
tiroide	1.7 $\pm$ 0.3	ND	NA				
vescica urinaria	8.3 $\pm$ 12.5	ND	ND				
totali	80.5 $\pm$ 15.4	98.4 $\pm$ 0.5	97.9 $\pm$ 1.9				

NA= non analizzati ND = non rilevato

²²³ Te-HA				²²³ Te-HA			
tessuti	²²³ Te	HyaMax	Nutrilhyl	tessuti	²²³ Te	HyaMax	Nutrilhyl
4 h				24 h			
sangue	0.1±0.0	0.3±0.2	0.3±0.1	sangue	ND	0.3±0.1	0.6±0.1
osso	ND	2.0±0.8	1.5±0.3	osso	ND	2.3±1.5	6.3±8.0
cervello	ND	ND	NA	cervello	ND	ND	NA
cuore	ND	ND	ND	cuore	ND	ND	ND
rene	10.9±2.5	0.1±0.0	0.1±0.0	rene	2.2±0.7	ND	0.1±0.0
ginocchio	ND	0.3±0.2	NA	ginocchio	ND	0.4±0.2	NA
intestino grande	0.2±0.2	10.0±9.8	8.5±8.8	intestino grande (1)	ND	21.3±10.4	21.8±11.1
intestino grande (2)	ND	26.3±13.6	25.9±11.5	intestino grande (2)	ND	15.4±7.2	19.8±9.1
fegato (1)	0.2±0.1	0.3±0.0	0.1±0.1	fegato (1)	ND	0.1±0.1	0.1±0.0
fegato (2)	0.2±0.2	0.2±0.1	0.1±0.1	fegato (2)	ND	0.1±0.0	0.1±0.0
polmone	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	polmone	ND	ND	0.1±0.0
muscolo	ND	3.4±1.8	4.5±1.5	muscolo	ND	4.3±2.3	4.2±1.9
pelle	ND	0.2±0.0	NA	pelle	ND	0.2±0.1	NA
intestino piccolo (1)	1.1±0.2	23.0±10.5	28.3±9.5	intestino piccolo (1)	0.4±0.2	3.2±1.5	3.7±1.6
intestino piccolo (2)	0.6±0.3	6.6±4.5	7.2±6.3	intestino piccolo (2)	ND	2.3±1.9	1.9±1.5
milza	ND	ND	ND	milza	ND	ND	ND
stomaco	23.1±5.4	22.4±3.9	18.5±1.6	stomaco	6.1±1.0	4.0±3.5	4.2±3.9
tiroide	1.1±0.2	ND	NA	tiroide	0.2±0.2	0.2±0.1	NA
vescica urinaria	8.5±1.7	0.2±0.1	0.1±0.1	vescica urinaria	1.5±0.6	0.1±0.0	0.1±0.0
totali	46.1±2.1	98.9±0.6	92.3±3.3	totali	10.4±1.4	54.4±22.1	62.9±25.6
6 h				48 h			
sangue	0.2±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	sangue	ND	0.9±0.3	0.9±0.2
osso	ND	1.1±0.5	1.1±0.5	osso	ND	2.9±1.7	6.3±4.4
cervello	ND	ND	NA	cervello	ND	ND	NA
cuore	ND	ND	ND	cuore	ND	ND	0.1±0.0
rene	0.8±0.4	ND	0.1±0.0	rene	0.8±0.3	ND	0.1±0.0
ginocchio	ND	0.3±0.1	NA	ginocchio	ND	0.5±0.1	NA
intestino grande	ND	28.5±11.3	27.7±9.5	intestino grande (1)	ND	8.6±5.6	5.3±4.8
intestino grande (2)	ND	41.7±13.7	41.7±9.0	intestino grande (2)	ND	4.3±4.2	3.9±3.6
fegato (1)	ND	0.1±0.0	0.1±0.0	fegato (1)	ND	0.2±0.1	0.1±0.1
fegato (2)	0.3±0.1	0.2±0.1	0.1±0.0	fegato (2)	ND	0.1±0.0	0.1±0.0
polmone	ND	ND	ND	polmone	ND	ND	0.1±0.0
muscolo	0.1±0.0	3.2±1.0	2.8±1.1	muscolo	ND	5.2±1.4	10.1±9.2
pelle	ND	0.2±0.1	NA	pelle	ND	0.3±0.2	NA
intestino piccolo (1)	0.2±0.1	12.4±9.6	12.4±9.2	intestino piccolo (1)	ND	0.3±0.1	0.3±0.1
intestino piccolo (2)	0.3±0.1	4.7±7.5	4.7±7.6	intestino piccolo (2)	ND	0.3±0.2	0.3±0.2
milza	ND	ND	ND	milza	ND	ND	0.1±0.0
stomaco	15.1±1.1	1.2±1.4	1.0±1.5	stomaco	2.1±0.3	0.7±0.5	0.7±0.5
tiroide	1.6±0.4	ND	NA	tiroide	0.3±0.2	0.2±0.1	NA
vescica urinaria	6.2±1.1	0.3±0.0	0.1±0.1	vescica urinaria	0.5±0.1	ND	0.1±0.0
totali	30.6±2.2	94.6±6.2	92.1±3.4	totali	3.7±0.3	23.9±8.3	28.5±9.2
12 h				72 h			
sangue	0.1±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	sangue	ND	0.9±0.1	NA
osso	ND	1.1±0.3	1.1±0.1	osso	ND	0.5±0.3	NA
cervello	ND	ND	NA	cervello	ND	ND	NA
cuore	ND	ND	ND	cuore	ND	ND	NA
rene	5.9±1.2	ND	0.1±0.0	rene	0.2±0.1	ND	NA
ginocchio	ND	0.2±0.1	NA	ginocchio	ND	0.1	NA
intestino grande	ND	43.1±6.0	37.3±19.4	intestino grande (1)	ND	2.1±0.7	NA
intestino grande (2)	ND	46.6±6.8	39.4±15.0	intestino grande (2)	ND	4.9±2.6	NA
fegato (1)	ND	0.2±0.0	0.2±0.0	fegato (1)	ND	0.2±0.1	NA
fegato (2)	ND	0.2±0.1	0.2±0.1	fegato (2)	ND	0.1±0.1	NA
polmone	ND	ND	ND	polmone	ND	ND	NA
muscolo	ND	2.5±1.0	2.3±0.7	muscolo	ND	0.4±0.1	NA
pelle	ND	0.1±0.1	NA	pelle	ND	0.2±0.2	NA
intestino piccolo (1)	0.4±0.2	0.3±0.1	0.2±0.2	intestino piccolo (1)	ND	0.3±0.1	NA
intestino piccolo (2)	0.1±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0	intestino piccolo (2)	ND	0.3±0.2	NA
milza	ND	ND	ND	milza	ND	ND	NA
stomaco	8.7±1.2	ND	0.1±0.0	stomaco	0.2±0.2	0.3±0.2	NA
tiroide	0.5±0.2	0.2±0.1	NA	tiroide	0.1±0.0	0.2±0.1	NA
vescica urinaria	6.8±0.6	ND	ND	vescica urinaria	ND	ND	NA
totali	22.4±1.8	94.9±6.5	81.6±26.5	totali	0.5±0.3	10.0±2.5	NA

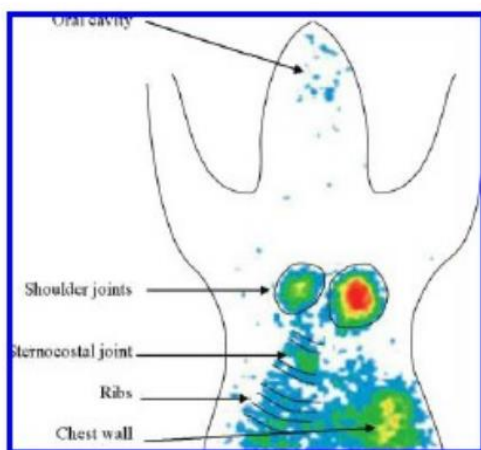


Figura 3. Vista ventrale della scansione scintigrafica del petto di un ratto dello studio pilota che mostra la biodistribuzione di radioattività quattro ore dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -hyaluronan (NutriHyl) nelle articolazioni, nelle ossa, nei muscoli e nelle ghiandole salivari.

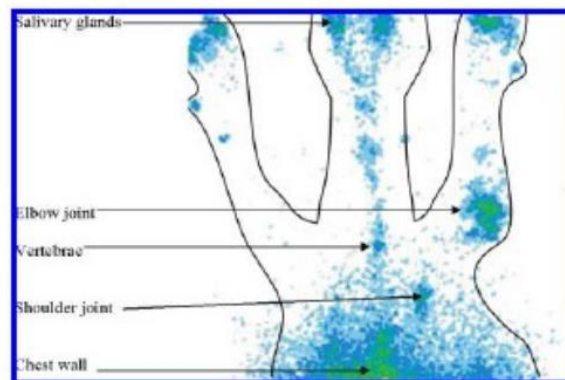


Figura 4. Vista ventrale della scansione scintigrafica del petto di un cane della studio pilota che mostra la biodistribuzione di radioattività due ore dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -hyaluronan (NutriHyl), nelle articolazioni, nelle ossa e nelle ghiandole salivari.

Studio di biodistribuzione scintigrafica in ratti e cani. La scintigrafia, le scansioni a corpo intero di ratti in entrambi gli studi sono state impostate a guadagno basso e hanno confermato i dati di distribuzione nei tessuti, con minore sensibilità (dati non indicati). Dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -P, la radioattività è stata trovata velocemente nell'intero corpo, come indicato da un'opacità bassa e diffusa da 30 min a sei ore.

Tiroide, reni e vescica urinaria hanno mostrato assorbimento da 0.5 a 6 h, ma la maggiore radioattività era associata con tessuti gastrointestinali. In momenti successivi (12, 24, 48 h), la radioattività è stata vista solo nelle regioni gastrointestinali.

Dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -HA la radioattività è entrata velocemente nell'intestino tenue prossimale, ed è stata notata attraversare il tratto gastrointestinale nel tempo, terminando come feci formate 12-24 h più tardi (dati non mostrati). La radioattività è entrata nell'intestino crasso tra 6 e 12 h. Non è presente visualizzazione di radioattività diffusa nell'intero corpo in alcun momento con impostazione di basso guadagno. Non è stata notata alcuna radioattività nella tiroide o nella vescica in alcun momento. Le scansioni ventrali del petto del ratto rilevate ad alto guadagno nello studio pilota quattro ore dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -HA hanno mostrato quantità misurabili di radioattività nelle articolazioni della spalla, vertebre e articolazioni sternocostali, ma non nella tiroide (**Figura 3**). Le immagini ventrali prese ad alto guadagno nello studio pilota nei cani e due quattro

ore dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -H hanno anche mostrato quantità misurabili di radioattività localizzate in ossa, articolazioni e ghiandole salivari, ma non nella tiroide nei cani (**Figure 4**).

Quindi, lo schema di distribuzione tissutale della radioattività differisce tra i gruppi $^{99m}\text{Tc-P}$ e $^{99m}\text{Tc-HA}$ rispecchiando e confermando lo schema visto nei dati di distribuzione nei tessuti.

L'autoradiografia da contatto ex vivo di campioni di tessuto connettivo dallo studio controllato ha mostrato una differenza marcata e radicale nell'assorbimento di radioattività tra i gruppi $^{99m}\text{Tc-P}$ and $^{99m}\text{Tc-HA}$ 24 h dopo la somministrazione (**Figura 5**).

Ciascun campione esaminato (femore, zampe anteriori, zampe posteriori, pelle e sezione di coda) ha mostrato maggiore ricezione di radioattività dal gruppo $^{99m}\text{Tc-HA}$, spaziando da valori da 113 a 342 volte maggiori rispetto alla ricezione da $^{99m}\text{Tc-P}$. L'assorbimento in femori puliti (comprese la cartilagine ad entrambe le estremità) ha mostrato che la radioattività è stata assorbita in tessuti connettivi diversi dalla pelle. La scintigrafia a colori di campioni di pelle di ratto 24 e 48 h dopo la somministrazione di $^{99m}\text{Tc-P}$ e $^{99m}\text{Tc-HA}$ ha mostrato risultati identici: virtualmente nessuna radioattività da campioni di pelle $^{99m}\text{Tc-P}$, ma evidente assorbimento di radioattività in campioni di pelle $^{99m}\text{Tc-HA}$ (dati non presentati). Così, è ovvio che il gruppo $^{99m}\text{Tc-HA}$ mostra assorbimento di radioattività significativamente aumentato nel tessuto connettivo se confrontato al gruppo di controllo $^{99m}\text{Tc-P}$.

Scansioni NanoSPECT/CT. La visualizzazione tridimensionale della radioattività nel corpo intero dei ratti ha permesso la localizzazione precisa della radioattività ingerita a impostazioni relativamente basse di guadagno. Le scansioni a corpo intero hanno permesso la selezione di aree di interesse, e le sezioni sagittali e coronali sono state quindi illustrate sulla base della posizione dei crocini. Le sezioni trasverse sono state selezionate dall'intersezione delle scansioni sagittali e coronali. Così, è stato possibile definire la localizzazione precisa della radioattività del tessuto sovrapponendo i tessuti come luogo di assorbimento, cosa non possibile con la scintigrafia.

Da 30 min a sei ore dopo la somministrazione di $^{99m}\text{Tc-P}$, la maggior parte della radioattività era presente nello stomaco, ma la radioattività era inequivocabilmente presente in tiroide, ghiandole salivari, saliva e vescica urinaria, oltre ad assorbimento da parte degli intestini e dei tessuti molli in tutto il corpo. Tuttavia, le immagini trasverse hanno conclusivamente determinato che la radioattività non era visualizzata nelle ossa e nelle articolazioni. A 12 h, la maggior parte della radioattività era ancora nello stomaco, con maggiore assorbimento negli intestini, comprese le feci formate.

Entro 24 h, la maggior parte della radioattività era scomparsa, sebbene la tiroide mostrasse ancora assorbimento, ma la radioattività non è stata vista a 48 h.

Con il guadagno impostato, la radioattività dopo la somministrazione di $^{99m}\text{Tc-HA}$ appariva rimanere nel tratto gastrointestinale, seguendo il normale transito intestinale.

L'assorbimento diffuso in tessuti molli come visto nel gruppo $^{99m}\text{Tc-P}$ non è stato visualizzato dopo $^{99m}\text{Tc-HA}$.

Parimenti, non era presente alcun assorbimento visibile di radioattività in tiroide, ghiandole salivari, reni o vescica urinaria dopo $^{99m}\text{Tc-HA}$.

Le scansioni nanoSPECT/CT rappresentative dalla sesta ora sono presentate nella **Figura 6**.

Sono state condotte scansioni NanoSPECT/CT ad alto guadagno anche su pezzi di tessuto connettivo per verificare se la radioattività è stata assunta nelle articolazioni e in quali compartimenti delle articolazioni, 48 h dopo la somministrazione (**Figura 7**). La radioattività è stata vista nella cartilagine all'estremità del femore, su ossa e articolazioni e nella pelle. Inoltre, la radioattività è stata vista nel tessuto che circonda il muscolo. Immagini trasverse attraverso gli spazi sinoviali di sei diverse articolazioni (tarsali, ginocchio, anca, carpale, gomito e spalla) hanno mostrato che la radioattività era visibile nel fluido sinoviale, cartilagine e osso. L'assorbimento non è stato visto nel gruppo $^{99m}\text{Tc-P}$ in questo punto temporale. Così, la resa per immagini tridimensionali della radioattività ha mostrato l'assorbimento nei tessuti dell'articolazione dopo l'ingestione di $^{99m}\text{Tc-HA}$.

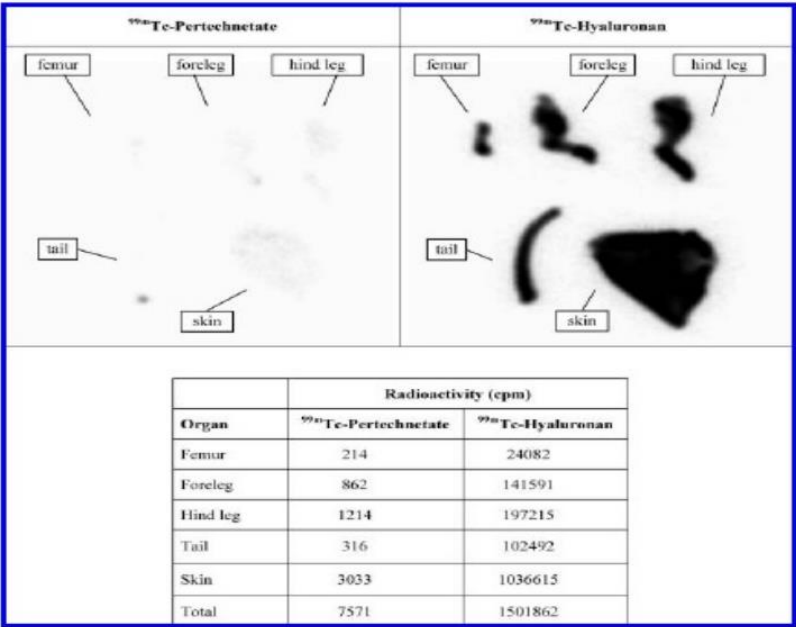


Figura 5. Scintigrammi ex vivo degli organi rimossi da due ratti 24 h dopo la somministrazione di $^{99m}\text{Tc-pertechnetate}$ o $^{99m}\text{Tc-hyaluronan}$ (HyaMax). Entrambi i ratti hanno ricevuto la stessa dose di radioattività (100 MBq).

DISCUSSIONE

Questa relazione presenta la prima prova di assorbimento e distribuzione in tessuti di HA ad alto peso molecolare somministrato oralmente. Gli autori non sono stati in grado di trovare altre relazioni nella letteratura rivista paritariamente e relativa all'assorbimento orale di HA quando tali esperimenti sono stati concepiti e condotti nel 2002-2003 e quando un estratto dello studio pilota è stato pubblicato nel 2004 (9). Sulla base della possibilità di assorbimento orale di acido ialuronico trovata nello studio pilota, e la necessità di conferma della scoperta precedentemente inesplorata, è stato condotto uno studio controllato per confrontare l'assorbimento di radioattività da isotopo radioattivo legato e libero (^{99m}Tc). Nell'esperimento controllato, il 13.3% della radioattività da H ingerito è rimasta negli animali dopo 72 h, rispetto al 5.6% di radioattività rimasta negli animali dopo la somministrazione di pertecnetato libero. Lo schema di assorbimento e rimozione dal corpo è significativamente diverso tra le due forme di radioattività, il che indica che l'assorbimento è stato diverso tra le due forme e suggerisce l'assorbimento dei tessuti di HA dopo ingestione orale. Diversi ragionamenti suggeriscono che la radioattività da HA ingerita rappresentasse assorbimento di una qualche forma di HA nella circolazione e nei tessuti.

Esistono tre grandi possibilità per spiegare i risultati osservati: (1) qualche quantità in tracce di radioattività contaminante non legata a HA ha influito sui risultati osservati; (2) la marcatura ^{99m}Tc è stata rimossa dall'HA dal metabolismo nelle cellule (microbi animali o intestinali); (3) HA intatto o parzialmente depolimerizzato è stato assorbito nella circolazione sistemica e assorbito dai tessuti periferici; e (4) una combinazione di queste possibilità. Considerando la prima possibilità, esisteva circa il 10% di radioattività nelle preparazioni ^{99m}Tc -HA usate in questa indagine derivante dai materiali iniziali. Il ^{99m}Tc -P era fino al 3% e ^{99m}Tc -stagno colloidale era il rimanente. Il ^{99m}Tc -P in ^{99m}Tc -HA si sarebbe comportato in modo simile al gruppo di controllo, con molta meno radioattività misurabile. Questo schema di assorbimento non è stato visto nei risultati ^{99m}Tc -HA; quindi il contributo di ^{99m}Tc -P contaminante ai risultati non è verosimile. Anche il rapido assorbimento di radioattività visto nei primi 30 min per il gruppo ^{99m}Tc -HA non rispecchia quello visto per ^{99m}Tc -P, basato sulla diversità dello schema di assorbimento dei tessuti con il gruppo di

controllo ^{99m}Tc -P. Lo stagno colloidale etichettato non è noto, ma verosimilmente presenta scarso assorbimento, come visto per simili metalli (10). Anche se tutto lo stagno colloidale è stato assorbito, la quantità di radioattività non recuperata (13.3%) eccedeva la quantità di radioattività di stagno colloidale (<10%). Lo stagno è noto per l'affinità con tessuti connettivi. Tuttavia, la rapida comparsa di radioattività nel tessuto osseo a 5 e 15 min dopo la somministrazione orale di ^{99m}Tc -HA (cfr. **Tabella 3**) potrebbe essere ascritta a piccole quantità di radioattività non- ^{99m}Tc -P e/o non- ^{99m}Tc -HA. Quindi, con la possibile eccezione dei primi due intervalli temporali nel tessuto osseo, non è verosimile che la contaminazione da materiali iniziali abbia potuto influire sui risultati osservati nel corso dello studio.

Poi, un'altra possibilità è la rimozione della marcatura ^{99m}Tc dall'HA, nel qual caso si sarebbero formati $^{99m}\text{Tc-P}$ e altri simili composti. La marcatura è stata rilevata stabile in presenza di plasma e fluido sinoviale, quindi è scarsamente verosimile che vi sia stata una rimozione non specifica di ^{99m}Tc da $^{99m}\text{Tc-HA}$ da fluidi corporei.

Questo lascia la possibilità che l'HA necessitasse di essere metabolizzato nei suoi più piccoli componenti da parte di azioni cellulari per rilasciare ^{99m}Tc libero. Il metabolismo di HA nei suoi componenti più piccoli si verifica nelle cellule (2), e questo richiede internalizzazione e degrado enzimatico. Questo potrebbe accadere in microbi gastrointestinali o nelle cellule proprie dell'animale o entrambi. Se le cellule degli animali degradano l'HA per rilasciare ^{99m}Tc , allora si sarebbe visto uno schema simile al gruppo di controllo, sebbene ritardato e con minore portata.

Lo schema di assorbimento dei tessuti non supporta questa possibilità: il rapporto dei valori radioattivi tra tessuti è molto diverso tra i gruppi $^{99m}\text{Tc-P}$ e $^{99m}\text{Tc-HA}$ (cfr. **Figura 2** e **Tabella 3**). Tuttavia, è ovvio dai risultati osservati che $^{99m}\text{Tc-HA}$ somministrato oralmente è rimasto nel lume dell'intero tratto gastrointestinale fino a 48 h ed era presente nelle feci, indicando la sua esposizione da microbi intestinali. Il passaggio del bolo $^{99m}\text{Tc-HA}$ nell'intestino crasso è stato visto dopo sei ore, e questo accade anche osservando il più grande accumulo di radioattività nei tessuti. Alcuni microbi sono noti possedere ialuronidasi, che ha la possibilità di degradare il $^{99m}\text{Tc-HA}$ in componenti di monosaccaride più piccoli. Questo potenzialmente rilascerebbe $^{99m}\text{Tc-P}$ libero per assorbimento ed escrezione nell'urina.

Tuttavia, lo schema di assorbimento dei tessuti e l'escrezione urinaria della radioattività per il $^{99m}\text{Tc-HA}$ non rispecchia quello del $^{99m}\text{Tc-P}$, indicando che i microbi intestinali in ratti e cani non hanno degradato il $^{99m}\text{Tc-HA}$ ad alcun livello apprezzabile, o che qualche ^{99m}Tc radioattivo rilasciato da $^{99m}\text{Tc-HA}$ è rimasto nelle cellule microbiche intestinali, non disponibile per l'assorbimento o per ulteriore dispersione. Infatti, la maggior parte della radioattività da $^{99m}\text{Tc-HA}$ è stata escreta con le feci, come indicato nella **Tabella 1** e nelle immagini scintigrafiche e nanoSPECT/CT (dati non indicati).

Queste scoperte indicano che la radioattività vista all'esterno del lume intestinale dopo sei ore non era una marcatura libera ^{99m}Tc , come ci si sarebbe attesi per il degrado microbico o cellulare di $^{99m}\text{Tc-HA}$ in ^{99m}Tc libero. Esiste ancora una possibilità che la radioattività nei tessuti possa essere dovuta a componenti di monomero degradato $^{99m}\text{Tc-HA}$, come *N*-acetilglucosamina o glucoronato, o anche HA oligosaccaridi, ma questi composti sono metabolizzati rapidamente dal fegato e altri tessuti (1, 2). Lo schema di assorbimento di radioattività osservato non sostiene neppure questa possibilità. Quindi, la terza possibilità, che la radioattività dei tessuti sia dovuta ad assorbimento di HA ad alto peso molecolare resta la spiegazione più verisimile per i risultati osservati.

Ulteriore sostegno alla spiegazione che l'assorbimento di radioattività dei tessuti fosse dovuto a HA intatto deriva dallo schema dell'assorbimento dei tessuti. L'HA è noto avere affinità con i tessuti connettivi e questi tessuti hanno mostrato accumulo di radioattività lungo tutto il periodo dello studio a ^{99m}Tc -HA, ma non dopo ^{99m}Tc -P. Soprattutto, le scoperte suggeriscono che una piccola quantità di HA somministrata oralmente è stata assorbita nella circolazione sistemica e assorbita dai tessuti connettivi. Altre prove sostengono le nostre scoperte di assorbimento orale di HA nei tessuti connettivi.

Inizialmente, l'assorbimento orale di altri glicosaminoglicani ad alto peso molecolare (10-40 kDa) nella circolazione e nei tessuti non è nuovo ed è stato riscontrato ripetutamente da molti ricercatori dopo avere somministrato ripetutamente condroitina, dermatan, heparan e/o solfati di eparina non frazionata a umani e altri mammiferi (11-41). Altre relazioni non trovano prova di assorbimento di condroitina solfati, ma queste relazioni presentavano tutti argomenti che spiegherebbero scarsa capacità di trovare assorbimento (42-45). La presente ricerca mostra il dato interessante che la percentuale della dose ingerita di altri

glicosaminoglicani (tra 5-20%) entrata in circolo era simile a quella qui riportata (11-41). Così, esiste un chiaro precedente per l'assorbimento parziale di grandi glicosaminoglicani dopo ingestione. Secondariamente, nella letteratura scientifica si trovano relazioni di effetti biologici dopo la somministrazione orale di HA ad alto peso molecolare in linea con le proprietà note dell'HA (1, 46-51).

Studi su animali hanno trovato significativi miglioramenti di spossatezza nei cavalli (46), perdita di sostanza ossea in topi ovariectomizzati (47) e riduzione del versamento articolare nei cavalli (48, 49), compreso un aumento dei livelli di HA sinoviale (49). Studi su umani utilizzando HA da solo (50) o in combinazione con altri nutrienti con presenza di HA come variabile maggiore (51) hanno riscontrato miglioramenti in caso di dolore articolare e relative funzioni in soggetti con osteoartrite. È importante notare che gli studi con somministrazione orale con HA ad alto peso molecolare non mostrano effetti proinfiammatori, come ci si aspetterebbe se l'HA fosse convertito o metabolizzato in piccoli oligosaccaridi di HA.

Sebbene gli effetti biologici della somministrazione orale di un agente non siano prova di assorbimento, una ragione plausibile per gli effetti è correlata all'assorbimento nella circolazione sistemica e nei tessuti. Quindi, altri studi hanno riscontrato che l'HA orale mostra attività biologica, simile alla situazione riportata per altri glicosaminoglicani, offrendo ulteriore sostegno alle scoperte relative all'assorbimento orale di cui alla presente ricerca.

Come terzo argomento, esiste prova di assorbimento nella circolazione portale e nel sistema linfatico di micro particelle ad alto peso molecolare ingerite oralmente.

Una letteratura ben sviluppata ha mostrato che in animali e umani normali, circa il 5-20% di microparticelle somministrate oralmente raggiungono il sangue portale e la linfa toracica (52). Bisogna notare la somiglianza percentuale della dose ingerita di microparticelle assorbite nella circolazione con la percentuale di dose HA ingerita rimanente negli animali dopo 72 h nella presente ricerca. La dimensione molecolare di HA in soluzione è vicina a 1 μm in diametro (2), cioè la portata di assorbimento linfatico delle microparticelle (52).

Aspetto interessante, l'assorbimento delle microparticelle è stato visto anche per la mucosa colica (52), che corrisponde alla tempistica di accumulo di radioattività nel tessuto connettivo del presente studio (cfr. **Tabella 3** e **Figure 2, 5, 7**).

La bioadesione è apparsa aumentare il legame della microparticella agli enterociti della mucosa e facilitare la penetrazione (53). L'HA mostra bioadesione almeno attraverso diversi tipi di recettori di superficie di cellule specifiche (2, 3, 54, 55). Quindi, in aggiunta alla prova di assorbimento dopo somministrazione orale dei glicosaminoglicani correlati, esiste prova sostanziale che micro particelle simili a HA in dimensione e bioadesione sono assorbite lungo la mucosa gastrointestinale e condotte alla circolazione portale e al sistema linfatico.

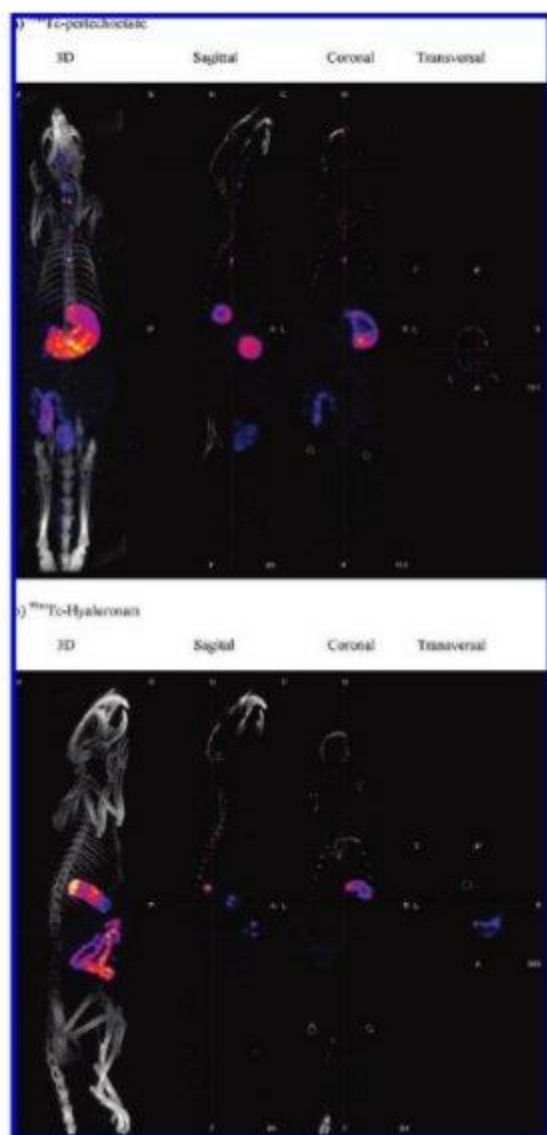


Figura 6. Scansioni NanoSPECT/CT di due ratti 6 h dopo la somministrazione di (a). ^{99m}Tc -pertechnetate o (b) ^{99m}Tc -hyaluronan (HyaMax). Entrambi i ratti hanno ricevuto la stessa dose di radioattività (100 MBq). Sono presentate le immagini a corpo intero (3D), sagittali, coronali e trasverse. La radioattività è chiaramente visibile in tiroide, ghiandole salivari, stomaco, vescica urinaria e tessuti molli dopo il Tc- pertechnetate, ma dopo il Tc-hyaluronan, solo il tratto alimentare mostra radioattività con questa impostazione di guadagno.

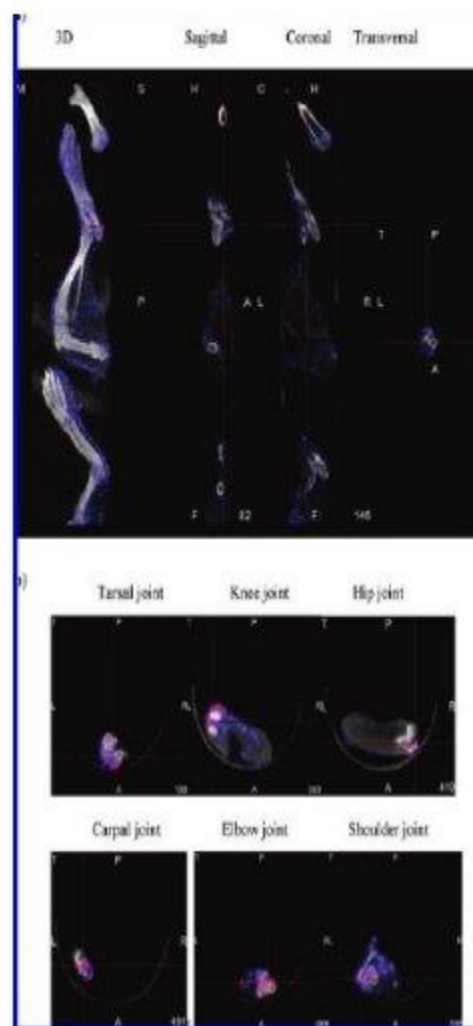


Figura 7. Scansioni NanoSPECT/CT di pezzi di tessuto connettivo di ratti ex vivo con maggiore guadagno 48 h dopo l'ingestione di 2000 MBq di ^{99m}Tc -hyaluronan (HyaMax) nello studio controllato. (a) Intero tessuto ex vivo (3D), immagini sagittale, coronale e trasverse di femore, zampa posteriore e anteriore (dall'alto verso il basso). La radioattività è apparente nella cartilagine all'estremità del femore e all'interno dell'articolazione tarsale, oltre che nella pelle e nei tessuti molli intorno alle ossa. (b) immagini trasverse lungo gli spazi sinoviali delle articolazioni tarsale, del ginocchio, anca, carpale, gomito e spalla che mostrano radioattività associata alle strutture (fluido sinoviale, cartilagine, ossa) oltre a un certo assorbimento nel muscolo.

Tuttavia, i risultati di questo studio non supportano un percorso portale di assorbimento della radioattività da ^{99m}Tc -HA, poiché nessuna radioattività apprezzabile è stata vista nel tessuto epatico in alcun momento. Poiché il fegato è il sito di maggior smaltimento di HA nel sangue, un percorso portale di accesso per l'HA orale non è verisimile, lasciando l'assorbimento linfatico quale soluzione rimanente.

I risultati osservati potrebbero essere spiegati con accesso linfatico e trasporto di ^{99m}Tc -HA, poiché la tempistica di assorbimento dei tessuti (dopo 6 h) e la capacità del sistema linfatico di raggiungere i tessuti connettivi coincide per apparenza e accumulo di radioattività.

Quarto punto, il trasporto linfatico di HA da/per i tessuti è un evento fisiologico normale (2, 56, 57). Il trasporto di HA ad alto peso molecolare tramite sistema linfatico, trasporto noto verso/da spazi sinoviali attraverso il sistema linfatico (2, 56, 57) e la presenza normale nel sangue e altri fluidi (2) offrono sostegno meccanicistico alla comparsa di HA ingerito oralmente nei tessuti connettivi. Inoltre, sono stati misurati condroitina solfati non marcati nel fluido sinoviale del ginocchio umano e nel plasma dopo somministrazione orale, a indicare che i glicosaminoglicani ingeriti possono transitare intatti verso il fluido sinoviale (30). Così, i mezzi con cui l'HA ingerito entra nella circolazione sistemica e transita verso i tessuti connettivi sono apparentemente eventi fisiologici normali.

Quinto punto, un'altra linea di prova a sostegno dell'assorbimento di HA orale nella circolazione sistemica è l'uso di HA nei fluidi di dialisi peritoneale. Breborowicz e colleghi hanno riportato che un fluido di dialisi peritoneale contenente 10 mg/dl di HA ad alto peso molecolare (1.2-2.4 MDa) portava all'assorbimento del 25% di HA in un periodo di otto ore nei ratti, con aumento misurabile del contenuto di HA nell'interstizio peritoneale e nel sangue (58). Questi risultati suggeriscono che l'HA ad alto peso molecolare può attraversare le membrane peritoneali e arrivare alla circolazione. Ha intraperitoneale è stato trovato accedere alla circolazione con aperture specializzate e linfatiche (stomata) normalmente presenti nel peritoneo sottodiaframmatico, anche per mezzo di assorbimento da parte dei vasi linfatici viscerali (58), cosa che metterebbe l'HA nel sistema linfatico. Quindi, i vasi linfatici hanno la capacità di assorbire e trasportare HA ad alto peso molecolare.

Sesto punto, di interesse per un possibile percorso di assorbimento è la scoperta in entrambi i gruppi ^{99m}Tc -HA che la comparsa di radioattività nei tessuti ha preceduto la comparsa nel sangue. Questa scoperta suggerisce che l'assorbimento linfatico e il trasporto di ^{99m}Tc -HA verso tessuti periferici potrebbe essersi verificato inizialmente, prima di qualsiasi assorbimento nel flusso sanguigno sia attraverso il dotto toracico o per accesso diretto. Inoltre, è noto che l'HA nel plasma è rapidamente assorbito e metabolizzato dal fegato (2). Tuttavia, i livelli di radioattività nel tessuto del fegato sono stati sempre trascurabili o assenti in entrambi i gruppi HA. Questa scoperta, oltre alla comparsa di radioattività nei tessuti prima che nel sangue suggerisce che l'HA è stato portato ai tessuti con un sistema di trasporto non sanguigno. L'assorbimento e il trasporto linfatici potrebbero spiegare questi riscontri.

Questo studio non caratterizza la forma molecolare di radioattività che raggiunge i tessuti. I tentativi di analizzare la distribuzione dimensionale della radioattività nel sangue e nei tessuti non hanno avuto successo. Quindi, è possibile che, parzialmente o interamente, la

radioattività osservata nei tessuti non fosse più annessa all'HA. Molte piste di prove diverse da quelle citate precedentemente sostengono che la radioattività fosse annessa a una forma di HA. Anzitutto, la condroitina solfato marcata ^{99m}Tc somministrata ad animali era associata con condroitina ad alto peso molecolare nel sangue e nei tessuti (14). Secondariamente, gli esperimenti di controllo hanno dimostrato che la su HA era stabile e con legame covalente. In terzo luogo, lo schema di distribuzione nel tessuto per ^{99m}Tc -HA non coincideva con lo schema mostrato dal pertecnetato libero, che è ben noto dall'uso nella scansione ossea e altre procedure di visualizzazione diagnostica. Il pertecnetato libero tende a concentrarsi nei reni e nella vescica urinaria piuttosto che essere visibile nella distribuzione dei tessuti per ^{99m}Tc -HA in **Tabella 3** e **Figura 2**.

I risultati riproducibili da due esperimenti separati suggeriscono che l'HA ad alto peso molecolare somministrato oralmente potrebbe raggiungere i tessuti periferici, comprese articolazioni e pelle, in piccole quantità.

Queste scoperte sostengono le relazioni di azioni biologiche viste dopo la somministrazione orale di HA ad alto peso molecolare in studi animali e umani (1, 46-51).

Quindi, esiste una base per includere l'HA in prodotti integratori alimentari in previsti per la salute delle articolazioni e della pelle. È necessaria ulteriore ricerca per identificare la composizione della radioattività nei tessuti dopo la somministrazione di ^{99m}Tc -HA, e per confermare gli effetti biologici dell'Ha potenzialmente assorbito.

ABBREVIAZIONI

^{99m}Tc , 99m tecnezio; ^{99m}Tc -HA, 99m acido ialuronico con marcatura al tecnezio; ^{99m}Tc -P, 99m tecnezio come pertecnetato; GBq, gigabecquerels; HA, hyaluronan/acido ialuronico/ialuronato di sodio; ITLC-SG, silica gel-impregnated thin-layer cromatografia su strato sottile impregnato di silica gel; kDa, kilodaltons; MBq, megabecquerels; MDa, megadaltons; TLC, cromatografia su strato sottile; WOMAC, scala di osteoartrite della Western Ontario and McMaster University. Alcune parti di questa ricerca sono presentati come poster Al meeting FASEB 2004 (studio pilota) e 2008 (studio controllato).

RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare per le competenze tecniche lo staff dell'Istituto di Ricerca per Radiobiologia e Radiogene, "Fodor Jo 'zsef", Centro Nazionale di Sanità, Budapest, Ungheria.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bucci, L. R.; Turpin, A. A. Will the real hyaluronan please stand up? *J. Appl. Nutr.* 2004, 54, 10–33.
- (2) Laurent, T. C.; Fraser, J. R. E. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992, 6, 2397–2404.
- (3) Kogan, G.; Soltes, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* 2007, 29, 17–25.
- (4) Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA). Public Law 103-417. *Fed. Regist.* 1994, 59, 4325-4329.
- (5) Samson, D. J.; Grant, M. D.; Ratko, T. A.; Bonnell, C. J.; Ziegler, K. M.; Aronson, N. Treatment of primary and secondary osteoarthritis of the knee. *Evidence Report/Technology Assessment No.157* (Prepared by Blue Cross and Blue Shield Association Technology Evaluation Center Evidence based Practice Center under Contract No. 290-02-0026). AHRQ Publication No. 07-E012. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. September 2007.
- (6) Campbell, J.; Bellamy, N.; Gee, T. Differences between systematic reviews/meta-analyses of hyaluronic acid/hyaluronan/Hylan in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15, 1424–1436.
- (7) Dilworth, J. R.; Parrott, S. J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27, 43–55.
- (8) Balogh, L.; Ocs, G.; Thuroczy, J.; Nemeth, T.; Lang, J.; Bodo, K.; Janoki, G. A. Veterinary nuclear medicine. Scintigraphical examination: a review. *Acta Vet. Brno* 1999, 68, 231–239.
- (9) Schauss, A. G.; Balogh, L.; Polyak, A.; Mathe, D.; Kiraly, R.; Janoki, G. Absorption, distribution and excretion of ^{99m}technetium labeled hyaluronan after single oral doses in rats and beagle dogs. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 2004, 18, A150-A151 [abstract 129.4]
- (10) Balogh, L.; Kerekes, A.; Bodo, K.; Kőrösi, L.; Janoki, G. A. [Evaluation of a complex trace element composition and bioutilization using isotope techniques and total body measurement]. *Orv. Hetil.* 1998, 139, 1297–1302.
- (11) Yamaguchi, T.; Horie, K.; Miyoshi, S.; Kobayashi, Y.; Nagatuka, M.; Okuyama, T. Studies on absorption, distribution and excretion of ³⁵S-sodium chondroitin polysulfate in rats. *Oyo Yakuri* 1972, (2), 405–413.
- (12) Morrison, L. M.; Schjeide, O. A.; Murata, K. Absorption, distribution, metabolism and excretion of acid mucopolysaccharides administered to animals and patients. In *Coronary Heart Disease and the Mucopolysaccharides (Glycosaminoglycans)*; Morrison, L. M., Schjeide, O. A. Eds.; Charles C. Thomas: Springfield, 1974; pp 109-127.

- (13) Konador, A.; Kawiak, J. Distribution of radioactivity in the mouse organism after administration of ³⁵S-chondroitin sulphate. *Folia Biol. (Krakow)* 1976, 24, 177–190.
- (14) Thilo, G. Etude de 35 cas d'arthrose traite's par l'acide chondroïtine sulfurique. [A study of 35 cases of arthrosis treated with Chondroitin Sulfuric Acid]. *Schweiz. Rundsch. Med./Prax.* 1977, 66, 1696–1699.
- (15) Pescador, R.; Diamantini, G.; Mantovani, M.; Malandrino, S.; Riva, A.; Casu, B.; Oreste, P. Absorption by the rat intestinal tract of fluorescein-labelled pig duodenal glycosaminoglycans. *Arzneim. Forsch.* 1980, 30, 1893–1896.
- (16) Pescador, R.; Madonna, M. Pharmacokinetics of fluoresceinlabelled glycosaminoglycans and of their lipoprotein lipaseinducing activity in the rat. *Arzneim. Forsch.* 1982, 32, 819–824.
- (17) Clevidence, B. A.; Failla, M. L.; Vercellotti, J. R.; Pescador, R. Pharmacokinetics of catalytically tritiated glycosaminoglycans in the rat. *Arzneim. Forsch.* 1983, 33, 228–230.
- (18) Gross, D. Orale chondroitin-Sulfatmedikation zur behandlung von arthrosen. [Oral chondroitin sulfate medication for the treatment of osteoarthritis]. *Therapiewoche* 1983, 33, 4238–4244.
- (19) Ronca, G.; Ronca-Testoni, S.; Lualdi, P. Pharmacocinetique du chondroitin sulfate-³H apre's administration orale chez l'animal [abstract]. *Z. Rheumatol.* 1988, 47, 325–326.
- (20) Dawes, J.; Hodson, B. A.; Pepper, D. S. The absorption, clearance and metabolic fate of dermatan sulphate administered to man-studies using a radioiodinated derivative. *Thromb. Haemostasis* 1989, 62, 945–949.
- (21) Dawes, J.; Hodson, B. A.; MacGregor, I. R.; Pepper, D. S.; Prowse, C. V. Pharmacokinetic and biological activities of dermatan sulfate (Mediolanum MF701) in healthy human volunteers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1989, 556, 292–303.
- (22) Palmieri, L.; Conte, A.; Giovannini, L.; Lualdi, P.; Ronca, G. Metabolic fate of exogenous chondroitin sulfate in the experimental animal. *Arzneim. Forsch.* 1990, 40, 319–323.
- (23) Conte, A.; Palmieri, L.; Segnini, D.; Ronca, G. Metabolic fate of partially depolymerized chondroitin sulfate administered to the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1991, 17, 27–33.
- (24) Conte, A.; de Bernardi, M.; Palmieri, L.; Lualdi, P.; Mautone, G.; Ronca, G. Metabolic Fate of Exogenous Chondroitin Sulfate in Man. *Arzneim. Forsch.* 1991, 41, 768–772.
- (25) Dawes, J.; McLaren, M.; Forbes, C.; Belch, J. J.; Lane, D. A.; Bray, B.; McEwen, J.; Houin, G.; Gianese, F. The pharmacokinetics of dermatan sulphate MF701 in healthy human volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1991, 32, 361–366.

- (26) Ronca, G.; Conte, A. Metabolic fate of partially depolymerised shark chondroitin sulfate in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 1993, 13, 27–34. 10592 *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 56, No. 22, 2008 Balogh et al.
- (27) Silvestro, L.; Lanzarotti, E.; Marchi, E.; Gori, M.; Pescador, R.; Ferro, L.; Nilani, M. R.; Da Col, R.; Coppini, A. Human pharmacokinetics of glycosaminoglycans using deuterium-labeled and unlabeled substances: evidence for oral absorption. *Semin. Thromb. Hemostasis* 1994, 20, 281–292.
- (28) Conte, A.; Volpi, N.; Palmieri, L.; Bahous, I.; Ronca, G. Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneim. Forsch.* 1995, 45, 918–925.
- (29) Volpi, N. Physico-chemical properties and the structure of dermatan sulfate fractions purified from plasma after oral administration in healthy human volunteers. *Thromb. Haemostasis* 1996, 75, 491–496.
- (30) Ronca, F.; Palmieri, L.; Panicucci, P.; Ronca, G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage* 1998, 6, 14–21.
- (31) Imanari, T.; Washio, Y.; Huang, Y.; Toyoda, H.; Suzuki, A.; Toida, T. Oral absorption and clearance of partially depolymerised fucosyl chondroitin sulfate from sea cucumber. *Thromb. Res.* 1999, 93, 129–135.
- (32) Eddington, N. D.; Du, J.; White, N. Evidence of the Oral Absorption of Chondroitin Sulfate as Determined by Total Disaccharide Content After Oral and Intravenous Administration to Horses. *A.A.E.P. Proc.* 2001, 47, 326–328.
- (33) Adebowale, A.; Du, L.; Liang, Z.; Leslie, J. L.; Eddington, N. D. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharm. Drug Dispos.* 2002, 23, 217–225.
- (34) Volpi, N. Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf) and its constituents in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10, 768–777.
- (35) Volpi, N. Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11, 433–441.
- (36) Barthe, L.; Woodley, J.; Lavit, M.; Przybylski, C.; Philibert, C.; Houin, G. In vitro intestinal degradation and absorption of chondroitin sulfate, a glycosaminoglycan drug. *Arzneim. Forsch.* 2004, 54, 286–292.
- (37) Du, J.; White, N.; Eddington, N. D. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse. *Biopharm. Drug Dispos.* 2004, 25, 109–116.
- (38) Lamari, F. N.; Theocharis, A. D.; Asimakopoulou, A. P.; Malakavi, C. J.; Karamanos, N. K. Metabolism and biochemical/ physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed. Chromatogr.* 2006, 20, 539–550.

- (39) Hiebert, L. M. Oral heparins. *Clin. Lab.* 2002, 48, 111–116. (40) Pineo, G; Hull, R; Marder, V. Oral delivery of heparin: SNAC and related formulations. *Best Pract. Res., Clin. Haematol.* 2004, 17, 153–160.
- (41) Arbit, E.; Goldberg, M.; Gomez-Orellana, I.; Majuru, S. Oral heparin: status review. *Thromb. J.* 2006, 4, 6.
- (42) Konador, A.; Kawiak, J. Changes in chondroitin sulfate concentration in rabbit blood plasma depending on the method of its administration. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1977, 25, 895–903.
- (43) Andermann, G.; Dietz, M. The influence of the route of administration on the bioavailability of an endogenous macromolecule: chondroitin sulphate (CSA). *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1982, 7, 11–16.
- (44) Baici, A.; Horler, D.; Moser, B.; Hofer, H. O.; Fehr, K.; Wagenhauser, F. J. Analysis of glycosaminoglycans in human serum after oral administration of chondroitin sulfate. *Rheumatol. Int.* 1992, 12, 81–88.
- (45) Jackson, C. G.; Plaas, A. H.; Barnhill, J. G.; Harris, C. L.; Clegg, D. O. The pharmacokinetics of oral glucosamine and chondroitin sulfate in humans [abstract 488 L13]. In *American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting: 13-17 November 2005; San Diego*; American College of Rheumatology: Atlanta, GA, 2005; p 15.
- (46) Pierce, S. W. Efficacy of orally administered sodium hyaluronate gel in the racing thoroughbred. In *Hyaluronan 2003 Proceedings. Chapter 6 Musculoskeletal System*: Balazs, E. A., Hascall, V. C. Eds.; Matrix Biology Institute: Cleveland, OH, 2004; pp 1-4.
- (47) Stancikova, M.; Svik, K.; Istok, R.; Rovensky, J.; Velebny, V. The effects of hyaluronan on bone resorption and bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Int. J. Tissue React.* 2004, 26, 9–16.
- (48) Bergin, B. J.; Pierce, S. W.; Bramlage, L. R.; Stromberg, A. Oral hyaluronan gel reduces post operative tarsocrural effusion in the yearling Thoroughbred. *Equine Vet. J.* 2006, 38, 375–378.
- (49) Martinez-Puig, D.; Carmona, J. U.; Arguelles, D.; Deulofeu, R.; Ubia, A.; Prades, M. Oral hyaluronic acid administration improves osteochondrosis clinical symptoms and slightly increases intraarticular concentration of hyaluronic acid in a horse model: a pilot survey. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15, C62-C63(abstract 96).
- (50) Kalman, D. S.; Heimer, M.; Valdeon, A.; Schwartz, H.; Sheldon, E. Effect of a natural extract of chickencombs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint[®]) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized doubleblind placebo-controlled trial. *Nutr. J.* 2008, 7 (3), 1–9.
- (51) Bucci, L. R.; Sheldon, E.; Schwartz, H.; Pachon, J.; Kalman, D.; Mederos, M.; Pezzullo, J. C.; Beer, C. Comparison between glucosamine with chondroitin sulfate and glucosamine with chondroitin sulfate and hyaluronate for symptoms of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13, S99.

- (52) Florence, A. T.; Jani, P. U. Oral uptake of microparticles across the gastrointestinal mucosa. In *Drug Targeting and Delivery: Concepts in Dosage Form Design*; Junginger, H. E., Ed.; Ellis Horwood: New York, NY, 1992; pp 113-128.
- (53) Thanos, C. G.; Yip, K. P.; Mathiowitz, E. Intestinal uptake of polymer microspheres in the rabbit studied with confocal microscopy. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2004, 19, 247–266.
- (54) Knudson, C. B.; Knudson, W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004 (Suppl. 427), 152-162.
- (55) Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007, 23, 435–461.
- (56) Liu, N. Metabolism of macromolecules in tissue. *Lymphat. Res. Biol.* 2003, 1 (1), 67–70.
- (57) Liu, N. Trafficking of hyaluronan in the interstitium and its possible implications. *Lymphology* 2004, 37 (1), 6–14.
- (58) Breborowicz, A.; Moberly, J. B.; Pawlaczyk, K.; Polubinska, A.; Kuzlan-Pawlaczyk, M.; Wieczorowska-Tobis, K.; Ogle, K.; Martos, L.; Oreopoulos, D. G. Effects of hyaluronan used as supplement in peritoneal dialysis solutions. In *Hyaluronan. Volume 2. Biomedical, Medical and Clinical Aspects*; Kennedy, J. F., Phillips, G. O., Williams, P. A., Hascall, V. C., Eds.; Woodhead Publishing Unlimited: Cambridge, England, 2002; Vol. 2, pp 453- 460.



Via VI Novembre 18, 28040 PARUZZARO (NO)

WWW.EUREKAVET.IT

info@eurekavet.it