

## Отчет о трансдермальной проницаемости крема Revalife™, содержащего глюкозамин

Авторы: Solomon T. Garner, JR., M.S., Phd. ([solgar@aol.com](mailto:solgar@aol.com)).

### Содержание

1. Перспективы применения глюкозамина.
2. Ограничения, касающиеся пероральных препаратов.
3. Потенциал применения местных препаратов с трансдермальной доставкой.
4. Исследования проницаемости кожи для Revalife™.
5. Заключение.
6. Литература

#### 1. Перспективы применения глюкозамина

В Европе глюкозамин использовали в течение более тридцати лет, начиная с 1970-х годов прошлого века, в качестве терапевтического препарата для лечения при остеоартрите [1, 2]. Таким образом, глюкозамина сульфат одобрен в качестве лекарственного средства, отпускаемого по рецепту, в некоторых европейских странах [3]. Эксперименты *in vitro* показали, что введение глюкозамина сульфата в человеческие хондроциты в тканевой культуре приводит к его включению в состав гликозаминогликанов (ГАГ), а также к активации синтеза ядерного белка, способствующего продукции протеогликана [4, 5].

Глюкозамин, образующийся в организме в виде глюкозамина 6-фосфата, является основным строительным блоком, необходимым для биосинтеза таких соединений, как гликолипиды, липопротеины, ГАГ, гиалуронаты и протеогликаны (рис. 1). Глюкозамин является нормальной составляющей в хрящевой матрице и синовиальной жидкости [6]. Глюкозамина 6-фосфат требуется для образования галактозамина, N-ацетилглюкозамина и хондроитинсульфата. Кератансульфат и гиалуронаты играют центральную роль в сборке хрящевых матриц и необходимы для поддержания структурной и функциональной целостности суставного хряща. Глюкозамина 6-фосфат требуется также для синтеза гиалуроновой кислоты, основы протеогликанов [7]. Данных о токсичности глюкозамина при высоких дозах нет. Экскреция в основном осуществляется через мочу и фекалии, причем из организма выводится 87% введенного перорально глюкозамина [8]. Основная гипотеза о действии глюкозамина заключается в том, что он позволяет обойти ограничивающий скорость метаболический блок при конверсии глюкозы в глюкозамин и стимулирует биосинтез ГАГ и гиалуроновой кислоты, необходимой для образования протеогликанов, обнаруженных в структурной матрице [5, 7].

Хотя терапевтическая польза глюкозамина и его аналогов изучены недостаточно [9], могут использоваться противовоспалительные способности экзогенного глюкозамина в уменьшении степени опухания и боли в суставах, сопоставимые с таковыми для НПВС [10-12]. Обнаружено, что при дегенерации хряща такие провоспалительные цитокины, как IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , связаны с повышенной деградацией хрящевой матрицы [13, 14]. Это также коррелирует с уменьшением экспрессии и синтеза гена хрящевой матрицы *in vitro* [15, 16]. По мнению некоторых авторов, экзогенный глюкозамин противодействует дегенеративным эффектам, которые IL-1 $\beta$  оказывает на синтез протеогликана [11, 15]. Также экзогенный глюкозамин снижает уровень образования оксида азота, индуцированного IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  [16], и подавляет синтез циклооксигеназы-2 человеческими хондроцитами в ответ на действие IL-1 $\beta$  [17, 18].

Кроме того, предполагается, что экзогенный глюкозамин активирует синтез ГАГ, способствуя продуцированию протеогликанов без ограничения превращения глюкозы в глюкозамин и, в конечном счете, в N-ацетил-D-глюкозамин (НАГ) глутамином (фруктозо-6-фосфат амидотрансфераза) [18]. Поскольку глюкоза и глюкозамин являются другими субстратами глюкокиназы [19], фосфорилированный глюкозамин (глюкозамин-6-фосфат) ингибирует глюкокиназу и изменяет последующий метаболизм как глюкозы, так и глюкозамина [20]. Miwa et al.

сообщили, что глюкокиназа имеет низкое сродство к НАГ [21]. То есть, НАГ киназа опосредует фосфорилирование НАГ для получения НАГ-6-фосфата, который не влияет на активность глюкокиназы [22-24]. Таким образом, НАГ-6-фосфат не влияет на активность глюкокиназы, тем самым позволяя глюкозе и глюкозамину оставаться неизменными в ходе метаболизма. С этой точки зрения биосинтезу ГАГ будет способствовать использование не глюкозамина, а НАГ или некоторых других ограничивающих синтез аналогов глюкозамина [16].

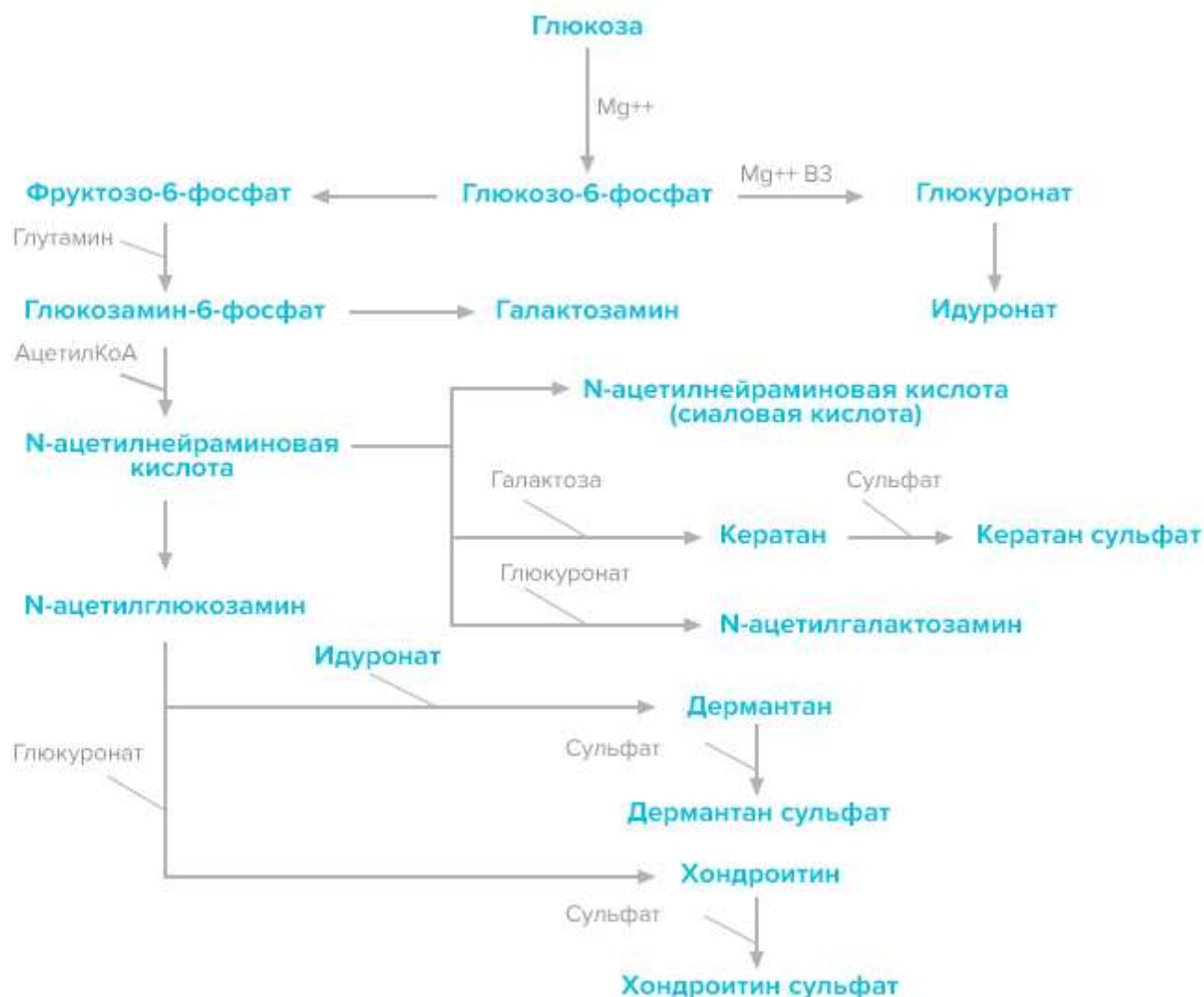


Рисунок 1. Гликозаминоновый биохимический метаболический путь продуцирования субстратов, участвующих в формировании кожи и хряща.

## 2. Ограничения, касающиеся пероральных препаратов

На перорально введенный глюкозамин, его соли и НАГ действует пресистемный метаболизм в печени [25]. Однако более поздние сообщения показывают, что эти агенты могут метаболизироваться главным образом в кишечнике, а не в печени [26]. Накоплено мало фармакокинетических данных о распределении этих агентов в суставном хряще. Setnikar et al. [27, 28] сообщили о фармакокинетических свойствах глюкозамина у собак и человека. По их оценкам, приблизительно 87% первоначальной дозы принятого перорально глюкозамина поглощается и выводится; <13% распространяется по всему организму и только <1% достигает остеоартритных суставов. Аналогичные данные о биодоступности были недавно опубликованы Eddington et al. из Университета штата Мэриленд, США [29], подтвердившими результаты многих работ Setnikar et al. С другой стороны, хондроитин представляет собой метаболит глюкозамина, который, как известно, деградирует до основных дисахаридных компонентов в кишечнике, прежде чем будет включен в дальнейший метаболизм для получения глюкозамина [30]. Хотя лишь небольшая часть глюкозамина

достигает «мишени» - суставного хряща (рис. 2), сообщается, что он с течением времени проявляет некоторую терапевтическую эффективность, от легкой до умеренной [31].

## Ограничения применения перорального глюкозамина



Рисунок 2. Схема, показывающая общий фармакокинетический путь перорального глюкозамина.

### 3. Потенциал применения местных препаратов с трансдермальной доставкой

Потенциал применения местных препаратов глюкозамина с трансдермальной доставкой имеет преимущества перед использованием традиционных пероральных лекарственных форм. Ключевым преимуществом является то, что устойчивое проникновение глюкозамина через кожу позволит обеспечить более стабильный уровень вещества в сыворотке. Это часто является целью применения лекарств с трансдермальной доставкой. Внутривенная инфузия более инвазивна, хотя и является конкурентной альтернативой. Важно, что трансдермальное введение позволяет обойти пресистемный метаболизм в печени - дополнительное ограничение пероральной доставки глюкозамина. Доставка глюкозамина через кожу позволила бы снизить шоковое воздействие на организм за счет уменьшения изменения пиковых концентраций в плазме, повышающего риск побочных эффектов. Известно, что глюкозамин продуцируется эндогенно в организме человека в соответствии с метаболическим путем, показанным на рисунке 1; очевидно, что для эффективной работы систем организма требуется относительно стабильный уровень глюкозамина в плазме. По мере старения и воздействия факторов активного образа жизни наши тела перестают производить достаточное количество метаболитов глюкозамина для поддержания здорового состояния кожи, хрящей и тканей. То есть, необходимо вводить в организм экзогенный глюкозамин для улучшения состояния этих тканей. Недавно был опубликован обзор под названием «Эффекты глюкозамина в организме человека: обзор воздействия на метаболизм глюкозы, побочные эффекты, соображения безопасности и эффективность» [32], в котором глюкозамин и его метаболиты охарактеризованы как безопасные и нетоксичные. Таким образом, глюкозамин и его метаболиты являются перспективными веществами для трансдермальной доставкой.

#### **4. Исследования проницаемости кожи для Revalife™**

Для всех исследований проницаемости *in vitro* в качестве модели кожи использовалась модельная мембрана. Проведены многочисленные эксперименты по оптимизации состава Revalife™ с использованием диффузионных ячеек Франца. Рецепторные ячейки заполняли 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,4 pH для имитации физиологического pH. Температуру рецепторного раствора поддерживали на уровне 37°C и перемешивали с помощью магнитной мешалки. Мембраны устанавливали между рецепторными и донорными ячейками. Поверхность, подвергавшаяся диффузии, составляла 2,54 см<sup>2</sup> (диаметр 1,8 см), а объем рецепторных ячеек составлял 6 см<sup>3</sup>. Сверху донорные ячейки покрывали пластиковой пленкой. Систему уравнивали при 37°C в течение 2 часов до каждого эксперимента.

Ячейки-доноры заполняли 5 мл Revalife. Образцы (N = 3) отбирали с интервалами в 24-48 часов, брали 200 мкл образцов рецепторных растворов и заменяли свежим буфером; эксперименты проводились в трех повторах. Количество НАГ, проникшего через «кожу», определялось с помощью метода высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (ВЭАХ-ИАД).

Глюкозамин, проникающий через модельную мембрану, был проанализирован в Центре по исследованию комплексных углеводов Университета Джорджии, США. Была использована ВЭАХ-ИАД (Dionex, Саннивейл, Калифорния, США) в системе Dionex DX-500, состоящей из градиентного насоса P40, электрохимического детектора ED40, автосамплера AS3500 и рабочей станции для хроматографии PeakNet. Аппарат ВЭАХ-ИАД был оснащен аналитической анионообменной колонкой CarboPac™ PA20 (3 × 150 мм) для быстрого разделения с высоким разрешением моносахаридов и дисахаридов с использованием импульсного амперометрического детектирования, аналитической защитной колонки CarboPac PA20 (3 × 30 Мм) и карбонатной предколонки (25 × 15 мм). В мобильной фазе (А) использовали дегазированную и деионизированную воду. В подвижной фазе (Б) использовали 0,02 Н NaOH, приготовленный на деионизированной воде и пропущенный через фильтры 0,45 мкм в аппарате для фильтрации растворителя (Waters-Millipore, Милфорд, Массачусетс, США), который дегазировали под вакуумом. Мобильная фазовая система работала при градиентной концентрации 16 мМ NaOH при скорости потока 0,5 мл/мин. Стандартная калибровочная кривая для НАГ (рис. 3.1 и 3.2) была получена с линейной регрессией ( $R^2 = 0,9936$ ). Каждый набор образцов выполнялся с использованием внешних стандартов. Значения концентрации образца были получены с помощью программного обеспечения Peak Net. Эти значения сравнивались с данными, полученными при расчетах площади пика и высоты пика, наблюдаемых как функции линейного уравнения регрессии стандартной кривой.

Стационарное состояние потока ( $J_{ss}$ ) для НАГ (мг/см<sup>2</sup>/ч) или (мкг/см<sup>2</sup>/ч) рассчитывалась по увеличению количества глюкозамина в рецепторной среде [34]. Коэффициент проницаемости НАГ ( $k_p$ ) в см/час рассчитывался по известным физико-химическим параметрам [35]. Экспериментальные коэффициенты проницаемости НАГ ( $K_p$ ) в см/час определялись делением  $J_{ss}$  на кумулятивную концентрацию в донорных ячейках. Время задержки ( $t_{lag}$ ) определялось графически по кумулятивному количеству глюкозамина из Revalife™, выделяемого на единицу площади (мг/см<sup>2</sup>) или (мкг/см<sup>2</sup>) в зависимости от времени (h). Для контроля скорости высвобождения глюкозамина *in vitro* (мг/см<sup>2</sup>) или (мкг/см<sup>2</sup>) определяли зависимость квадратного корня показателя времени ( $t_{1/2}$ ) от кумулятивного количества лекарственного средства, высвобождаемого на единицу площади (мг/см<sup>2</sup>) или (мкг/см<sup>2</sup>). [36] Все данные были представлены в соответствии с отраслевыми протоколами руководства Управления по контролю качества пищевых продуктов и медицинских препаратов США (FDA) [37].

#### **5. Заключение**

Применение глюкозамина дает надежду пациентам с остеоартритом (ОА), поскольку в ряде рассмотренных научных исследований было показано, что он облегчает симптомы боли и воспаления, связанные с ОА. Наиболее важно то, что он предохраняет суставы от дальнейшего ухудшения их состояния. В нескольких исследованиях было показано, что глюкозамин не только способствует улучшению состояния суставов, но также инвертирует течение ОА. Национальные

институты здоровья США (National Institutes of Health) в настоящее время проводят продолжающееся многоцентровое исследование, названное Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial (GAIT; исследование применения глюкозамина/хондроитина при артритах). Его результаты планируется получить осенью 2005 года. В ранних отчетах было указано, что это исследование в значительной степени подтвердит преимущества ОА в отношении глюкозамина, описанные в публикациях о предыдущих исследованиях.

Однако эффективность глюкозамина при лечении ОА значительно ограничена доступными методами его введения в организм. В настоящее время глюкозамин продается в виде таблеток, капсул, порошков, напитков, кремов и гелей. К сожалению, лишь менее 1% перорально вводимых доз достигают суставов. Глюкозамин в составе современных кремов и гелей не проникает через кожу. Следовательно, в то время как методы пероральной доставки могут обеспечить достаточное количество глюкозамина для некоторых лиц с легкой ОА, они не обеспечивают достаточного количества для страдающих ОА с более серьезными проблемами.

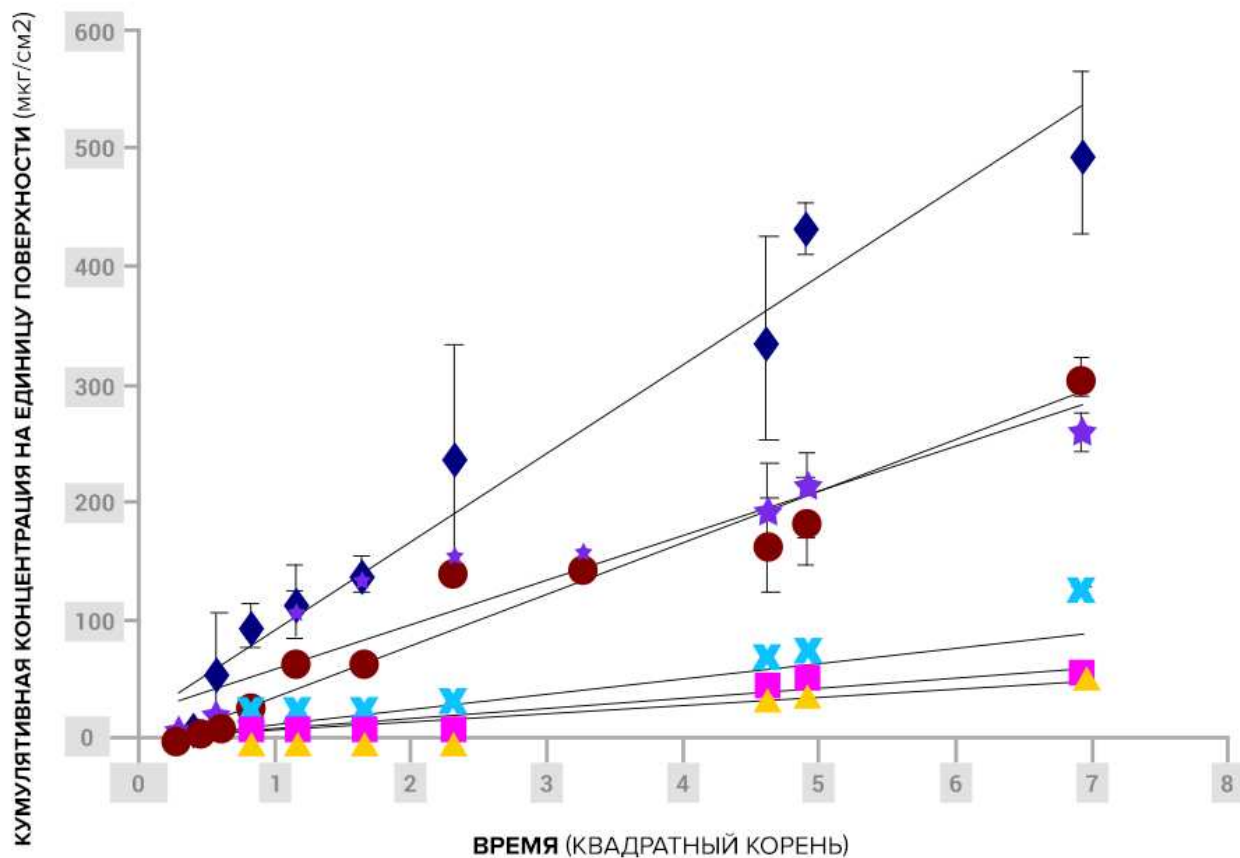
Исследования *in vitro* продемонстрировали, что молекула глюкозамина в составе Revalife™, метаболит глюкозамина, обладает превосходным свойством проникать через мембраны путем трансдермального транспорта и/или чрескожного всасывания.

Препарат III А показал наилучшие скорость высвобождения, стационарное состояние потока и коэффициент проницаемости, (табл. 1). Данные показывают хорошие результаты проницаемости как для III А, так и для III Б. Однако скорости высвобождения препаратов II Б и III Б являются сопоставимыми. Для сравнения,  $J_{ss}$  и коэффициент проницаемости НАГ значительно выше для вещества-носителя III А, чем для III Б. Упрощенное графическое сравнение полученных физико-химических данных показано на рисунке 3.1 и 3.2. Исходя из этих данных, разработали оптимальную лекарственную форму Revalife™, показатели для которой были сопоставимы с показателями для II Б, III Б и III А.

Площадь «кожи» в модельной системе намного меньше, чем у средняя площадь кожи человека, покрывающей сустав. Поэтому экстраполяция данных, полученных для Revalife™, дает гораздо больший, чем 15 мг, потенциал проникновения глюкозамина в кожу. Это касается скорости высвобождения вещества и величины  $J_{ss}$ . Оптимальная форма, III А, дает скорость стабильного высвобождения 10,3 мг/см<sup>2</sup>/час. Количество 15 мг эквивалентно 1%, получаемому при дозировке 1500 мг пероральных препаратов глюкозамина, принимаемых 4 раза в день. Проблема в том, что гораздо меньше 1% при такой ежедневной дозе достигает сустава. Вывод заключается в том, что для коленного сустава используется буквально один грамм препарата Revalife, содержащий 100 мг молекулы глюкозамина. В течение двух часов более 99% ± проникнут через кожу. Таким образом, доставка вещества к суставу, пораженному ОА, превысит 15 мг, эквивалентных приему в дозе 1500 мг 4 раза в день оральных препаратов глюкозамина в виде порошков, таблеток, напитков и т. д.

**Таблица 1. Физико-химические данные, полученные для проникновения молекулы глюкозамина при использовании Revalife™**

	$J_{ss}$ (mg/cm <sup>2</sup> /h)	Скорость высвобождения (мг/см <sup>2</sup> )	$k_p$ (см/ч)	$t_{lag}$ (ч <sup>2</sup> )
I А	1,01	6,88	$3,2 \times 10^{-3}$	6,45
II А	1,06	8,94	$3,1 \times 10^{-3}$	3,98
III А	10,3	74,9	$3,2 \times 10^{-1}$	0,85
I Б	2,16	14,6	$3,1 \times 10^{-4}$	5,33
II Б	6,98	38,5	$2,5 \times 10^{-4}$	6,98
III Б	4,46	43,1	$6,8 \times 10^{-4}$	3,49



◆ III A    ■ II A    ▲ IA    ✕ IB    ☆ II B    ● III B

Рисунок 3.1. Физико-химические данные, полученные для проникновения глюкозамина в составе Revalife™ из различных оптимальных/неоптимальных носителей. Кумулятивная концентрация (n=3) на единицу поверхности ± стандартное отклонение в зависимости от квадратного корня времени.

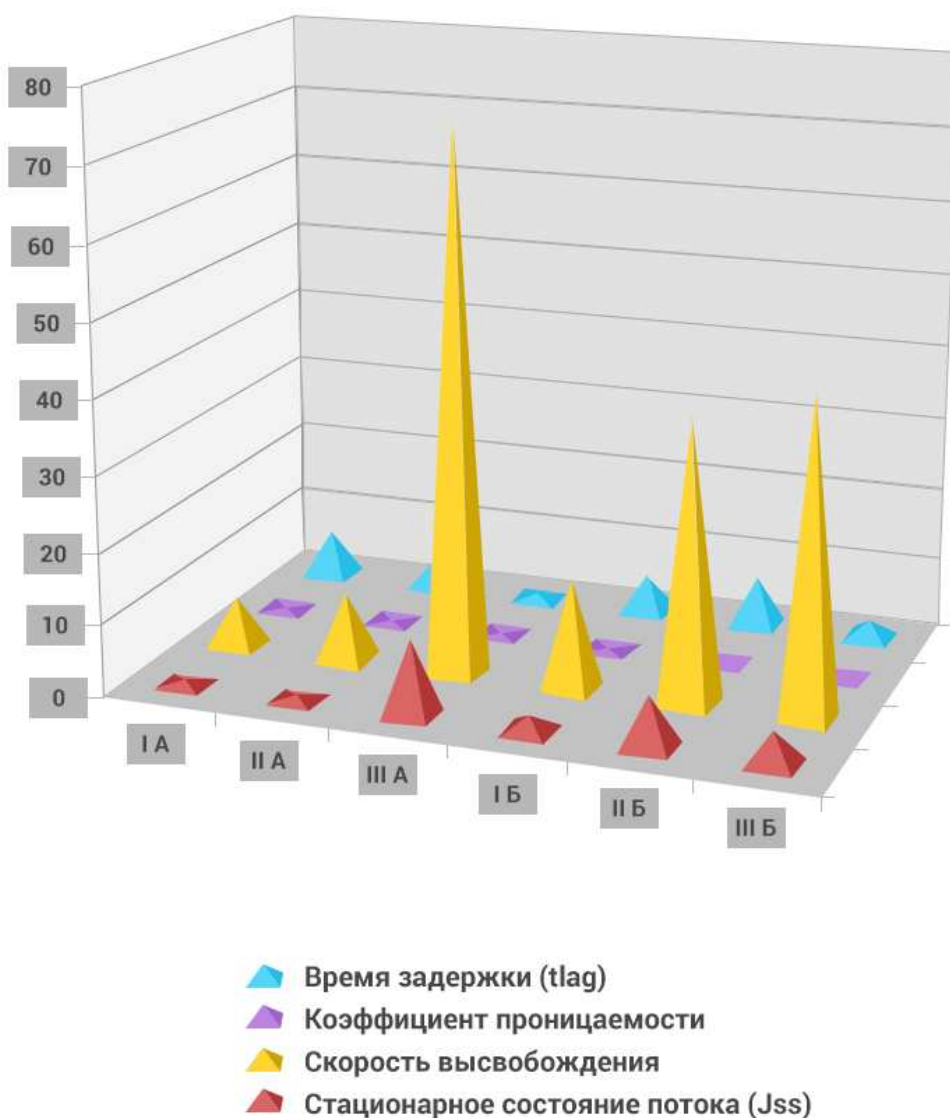


Рисунок 3.2. Графическое сравнение физико-химических данных, полученных для проникновения НАГ.

## 6. Литература

- 1) Lewis, C. "Arthritis: Timely Treatments for an Ageless Disease." *U.S. Food and Drug Administration Consumer Magazine* August 2000.
- 2) McCarty, M. F. "Enhanced synovial production of hyaluronic acid may explain rapid clinical responses to high-dose glucosamine in Osteoarthritis." *Medical Hypothesis* (1998), 50, 507-510.
- 3) Hauselmann, H. J. "Nutripharmaceuticals for Osteoarthritis." *Best Practice and Research*. (2001) 5(4), 598-607
- 4) Brief, A. A., Maurer, M., Di Cesare, P. E.. "Use of Glucosamine and Chondroitin Sulfate in the management of Osteoarthritis." *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 9(2 ) March/April 2001
- 5) Theodasakis, J., Fox, B., Adderly, B. *The Arthritis Cure*. 1st Edition. St. Martin's Press. New York, NY. 1997
- 6) Montaudo, M. "Molar mass distributions by size exclusion chromatography." *Macromolecules*. 31, 3839-3845.
- 7) Kelley, G. "The Role of Glucosamine Sulfate and Chondroitin Sulfate in the treatment of degenerative joint disease." *Alternative Medicine Review* (1998) 3(1).

- 8) Lamari, F. N., Militopoulou, M., Mitropoulou, T. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biological samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomed. Chromatogr.* 2002 16, 95-102.
- 9) Towheed, T.E. and Anastassiades, T.P. Glucosamine and chondroitin for treating symptoms of osteoarthritis: evidence is widely touted but incomplete. *J Am Med Assoc* (2000) 283, 1483-1484.
- 10) Lopes, Vaz A. Double-blind clinical evaluation of the relative efficacy of ibuprofen and glucosamine sulphate in the management of osteoarthrosis of the knee in outpatients. *Curr Med Res Opin* (1982) 8, 145-149.
- 11) Muller-Fassbender, H., Bach G.L., Haase, W., Rovati, L.C., and Setnikar, I. Glucosamine sulfate compared to ibuprofen in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* (1994) 2, 61-69.
- 12) Ruane, R. and Griffiths, P. Glucosamine therapy compared to ibuprofen for joint pain. *Br J Community Nurs* (2002) 7, 148-152.
- 13) Sandy J. D., Gamett, D., Thompson, V., and Verscharen, C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine. *Biochem J* (1998) 335, 59-66.
- 14) Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., and Noda, M. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* (2000) 275, 10738-10744.
- 15) Goldring, M.B., Fukuo, K., Birkhead, J.R., Dudek, E., and Sandell, L.J. Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon- of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* (1994) 54, 85-99.
- 16) Seguin, C.A. and Bernier, S.M. TNF suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: role of MEK1/2 and NF-B signaling pathways. *J Cell Physiol* (2003) 197, 356-369.
- 17) Gouze, J.N., Bianchi, A., Becuwe, P., Dauca, M., Netter, P., Magdalou, J., Terlain B., and Bordji, K. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level and by inhibiting the NF-B pathway. *FEBS Lett.* (2002)510, 166-170
- 18) Shikhman, A.R., Kuhn, K., Alaaeddine, N., and Lotz, M. N-Acetylglucosamine prevents IL-1-mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol* (2001) 166, 5155-5160.
- 19) Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, and Herrero-Beaumont. Glucosamine inhibits IL-1-induced NFB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (2003) 11, 290-298.
- 20) McClain, D.A. and Crook, E.D. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* (1996) 45, 1003-1009.
- 21) Singh, L.P., Andy, J., Anyamale, V., Greene, K., Alexander, M., and Crook, E.D. Hexosamine-induced fibronectin protein synthesis in mesangial cells is associated with increases in cAMP responsive element binding (CREB) phosphorylation and nuclear CREB: the involvement of protein kinases A and C. *Diabetes* (2001) 50, 2355-2362.
- 22) Van Schaftigen, E. Glucosamine-sensitive and -insensitive detritiation of [2-3H]glucose in isolated rat hepatocytes: a study of the contributions of glucokinase and glucose-6-phosphatase. *Biochem J* (1995) 308, 23-29.
- 23) Virkamaki, A. and Yki-Jarvinen, H. Allosteric regulation of glycogen synthase and hexokinase by glucosamine-6-phosphate during glucosamine-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Diabetes* (1999) 48, 1101-1107.
- 24) Miwa, I., Mita, Y., Murata, T., Okuda, J., Sugiura, M., Hamada, Y., and Chiba, T. Utility of 3-O-methyl-N-acetyl-D-glucosamine, an N-acetylglucosamine kinase inhibitor, for accurate assay of glucokinase in pancreatic islets and liver. *Enzyme Protein* (1994) 48, 135-142.
- 25) Setnikar, I.; Giacchetti, C.; Zanol, G. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and in man. *Arzneimittel-Forschung* 1986, 36(4), 729-35. Aghazadeh-Habashi, A.; Sattari, S.; Pasutto, F.; Jamali, F. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. 2000 5(2), 181-184.
- 26) Setnikar, I.; Palumbo, R.; Canali, S.; Zanol, G. Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Arzneimittel-Forschung* 1993, 43(10), 1109-13.
- 27) Setnikar, I.; Giacchetti, C.; Zanol, G. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and in man. *Arzneimittel-Forschung* 1986, 36(4), 729-35.
- 28) Setnikar I; Rovati L C Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. *Arzneimittel-Forschung* 2001, 51(9), 699-725.



- 29) 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. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2004, 25(3), 109-116.
- 30) Lamari, F. N., Militsopoulou, M., Mitropoulou, T. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biological samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomed. Chromatogr.* 2002 16, 95-102.
- 31) McAlindon; T. E., LaValley; M. P., Gulin; J. P. Felson, D. T. Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis: A Systematic Quality Assessment and Meta-analysis., *JAMA.* 2000, 283, 1469-1475.
- 32) J. W. Anderson, R.J. Nicolosi and J.F. Borzelleca, Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 43, Issue 2, February 2005, Pages 187-201.
- 33) a) Garner, Jr., Solomon T., Israel, Bridg'ette J., Abney, Trina, Azadi, Parastoo, Capomacchia, Anthony C. Preliminary Studies on the Transdermal Permeability of N-Acetyl-D-Glucosamine.(NAG): An Active Metabolite of Glucosamine. *Unpublished* b Garner, Jr., Solomon T., Israel, Bridg'ette J., Abney, Trina, Azadi, Parastoo, Capomacchia, Anthony C.. Permeation Studies of NAG from Pluronic-Organogel Formulations. *Unpublished*
- 34) Lamari, F. N., Militsopoulou, M., Mitropoulou, T. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biological samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomed. Chromatogr.* 2002 16, 95-102.
- 35) Towheed, T.E. and Anastassiades, T.P. Glucosamine and chondroitin for treating symptoms of osteoarthritis: evidence is widely touted but incomplete. *J Am Med Assoc* (2000) 283, 1483-1484.
- 36) Lopes, Vaz A. Double-blind clinical evaluation of the relative efficacy of ibuprofen and glucosamine sulphate in the management of osteoarthrosis of the knee in outpatients. *Curr Med Res Opin* (1982) 8, 145-149.
- 37) Guidance for Industry: SUPAC-SS Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Control; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.