

## Звіт про трансдермальну проникність крему Revalife™, що містить глюкозамін

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

### Зміст

1. Перспективи застосування глюкозаміну.
2. Обмеження, що стосуються пероральних препаратів.
3. Потенціал застосування місцевих препаратів з трансдермальною доставкою.
4. Дослідження проникності шкіри для Revalife™.
5. Висновок.
6. Література.

### 1. Перспективи застосування глюкозаміну

В Європі глюкозамін використовували протягом більше тридцяти років, починаючи з 1970-х років минулого століття, як терапевтичний препарат для лікування при остеоартриті [1, 2]. Таким чином, глюкозаміну сульфат схвалений в якості лікарського засобу, що відпускається за рецептом, в деяких європейських країнах [3]. Експерименти *in vitro* показали, що введення глюкозаміну сульфату в людські хондроцити в тканинній культурі призводить до його включення до складу глікозаміногліканів (ГАГ), а також до активації синтезу ядерного білка, що сприяє продукції протеоглікана [4, 5].

Глюкозамін, що утворюється в організмі у вигляді глюкозаміну 6-фосфату, є основним будівельним блоком, необхідним для біосинтезу таких з'єднань, як гліколіпіди, ліпопротеїни, ГАГ, гіалуронат і протеоглікани (рис. 1). Глюкозамін є нормальною складовою хрящової матриці і синовіальної рідини [6]. Глюкозаміна 6-фосфат потрібен для утворення галактозаміну, N-ацетилглюкозамін і хондроїтінсульфата. Кератансульфатів і гіалуронати грають центральну роль в збірці хрящових матриць і необхідні для підтримки структурної та функціональної цілісності суглобового хряща. Глюкозаміна 6-фосфат потрібні також для синтезу гіалуронової кислоти, основи протеогліканів [7]. Даних про токсичність глюкозаміну при високих дозах немає. Екскреція в основному здійснюється через сечу і фекалії, причому з організму виводиться 87% введеного перорально глюкозаміну [8]. Основна гіпотеза про дію глюкозаміну полягає в тому, що він дозволяє обійти обмежуючий швидкість метаболічний блок при конверсії глюкози в глюкозамін і стимулює біосинтез ГАГ і гіалуронової кислоти, необхідної для утворення протеогліканів, виявлених в структурній матриці [5, 7].

Хоча терапевтична користь глюкозаміну і його аналогів вивчені недостатньо [9], можуть використовуватися протизапальні властивості екзогенного глюкозаміну в зменшенні ступеня набрякання і болю у суглобах, можна порівняти з такими для НПЗП [10-12]. Виявлено, що при дегенерації хряща такі прозапальні цитокіни, як IL-1 $\beta$  і TNF $\alpha$ , пов'язані з підвищеною деградацією хрящової матриці [13, 14]. Це також корелює зі зменшенням експресії і синтезу гена хрящової матриці *in vitro* [15, 16]. На думку деяких авторів, екзогенний глюкозамін протидіє дегенеративним ефектам, які IL-1 $\beta$  впливає на синтез протеоглікана [11, 15]. Також екзогенний глюкозамін знижує рівень утворення оксиду азоту, індукованого IL-1 $\beta$  і TNF $\alpha$  [16], і пригнічує синтез циклооксигенази-2 людськими хондроцитами у відповідь на дію IL-1 $\beta$  [17, 18].

Крім того, передбачається, що екзогенний глюкозамін активує синтез ГАГ, сприяючи продукуванню протеогліканів без обмеження перетворення глюкози в глюкозамін і, в кінцевому рахунку, в N-ацетил-D-глюкозамін (НАГ) глутаміном (фруктозо-6-фосфат амідотрансферази) [18]. Оскільки глюкоза і глюкозамін є іншими субстратами глюкокінази [19], фосфорілований глюкозамін (глюкозамін-6-фосфат) пригнічує глюкокіназу і змінює наступний метаболізм як глюкози, так і глюкозаміну [20]. Miwa et al. повідомили, що глюкокіназа має низьку спорідненість до НАГ [21]. Тобто, НАГ кіназа опосередковує фосфорілування НАГ для отримання НАГ-6-фосфату, який не впливає на активність глюкокінази [22-24]. Таким чином, НАГ-6-фосфат не впливає на активність

глюкокінази, тим самим дозволяючи глюкозі і глюкозамінам залишатися незмінними в ході метаболізму. З цієї точки зору біосинтезу ГАГ сприятиме використання не глюкозаміну, а НАГ або деяких інших обмежуючих синтез аналогів глюкозаміну [16].

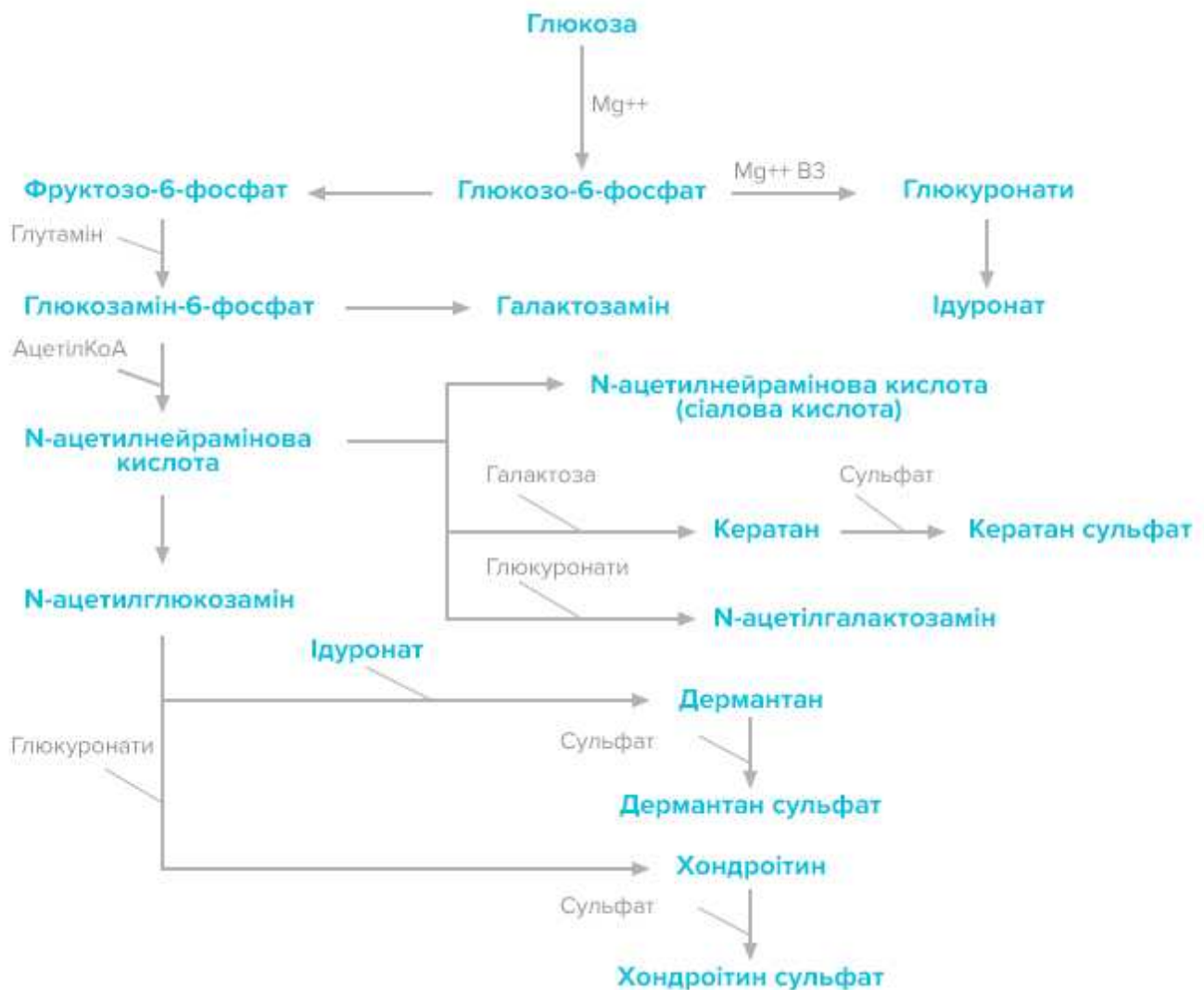


Рисунок 1. Глюкозаміновий біохімічний метаболічний шлях продукування субстратів, які беруть участь у формуванні шкіри і хряща.

## 2. Обмеження, що стосуються пероральних препаратів

На перорально введений глюкозамін, його солі та НАГ діє пресистемний метаболізм в печінці [25]. Однак більш пізні повідомлення показують, що ці агенти можуть метаболізуватися головним чином в кишечнику, а не в печінці [26]. Накопичено мало фармакокінетичних даних про розподіл цих агентів в суглобовому хрящі. Setnikar et al. [27, 28] повідомили про фармакокінетичні властивості глюкозаміну у собак і людини. За їхніми оцінками, приблизно 87% початкової дози прийнятого перорально глюкозаміну поглинається і виводиться; <13% поширюється по всьому організму і тільки <1% досягає остеоартритних суглобів. Аналогічні дані про біодоступності були недавно опубліковані Eddington et al. з Університету штату Меріленд, США [29], які підтвердили результати багатьох робіт Setnikar et al. З іншого боку, хондроїтин є метаболіт глюкозаміну, який, як відомо, деградує до основних дісахаридних компонентів в кишечнику, перш ніж буде включений в подальший метаболізм для отримання глюкозаміну [30]. Хоча лише невелика частина глюкозаміну досягає «мішені» - суглобового хряща (рис. 2), повідомляється, що він з часом проявляє деяку терапевтичну ефективність, від легкого до помірного [31].

## Обмеження застосування перорального глюкозаміну



Рисунок 2. Схема, що показує загальний фармакокінетичний шлях перорального глюкозаміну.

### 3. Потенціал застосування місцевих препаратів з трансдермальною доставкою

Потенціал застосування місцевих препаратів глюкозаміну з трансдермальною доставкою має переваги перед використанням традиційних пероральних лікарських форм. Ключовою перевагою є те, що стійке проникнення глюкозаміну через шкіру дозволить забезпечити більш стабільний рівень речовини в сироватці. Це часто є метою застосування ліків з трансдермальною доставкою. Внутрішньовенна інфузія більш інвазивна, хоча і є конкурентною альтернативою. Важливо, що трансдермальне введення дозволяє обійти пресистемний метаболізм в печінці - додаткове обмеження пероральної доставки глюкозаміну. Доставка глюкозаміну через шкіру дозволила б знизити шоківий вплив на організм за рахунок зменшення зміни пікових концентрацій в плазмі, підвищує ризик побічних ефектів. Відомо, що глюкозамін продукується ендогенно в організмі людини відповідно до метаболічного шляху, показаним на рисунку 1; очевидно, що для ефективної роботи систем організму потрібно відносно стабільний рівень глюкозаміну в плазмі. У міру старіння і впливу чинників активного способу життя наші тіла перестають виробляти достатню кількість метаболітів глюкозаміну для підтримки здорового стану шкіри, хрящів і тканин. Тобто, необхідно вводити в організм екзогенний глюкозамін для поліпшення стану цих тканин. Нещодавно був опублікований огляд під назвою «Ефекти глюкозаміну в організмі людини: огляд впливу на метаболізм глюкози, побічні ефекти, міркування безпеки і ефективність» [32], в якому глюкозамін і його метаболіти охарактеризовані як безпечні і нетоксичні. Таким чином, глюкозамін і його метаболіти є перспективними речовинами для трансдермальної доставки.

### 4. Дослідження проникності шкіри для Revalife™

Для всіх досліджень проникності *in vitro* в якості моделі шкіри використовувалася модельна мембрана. Проведено численні експерименти по оптимізації складу Revalife™ з використанням дифузійних осередків Франца. Рецепторні осередки заповнювали 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,4 рН для імітації фізіологічного рН. Температуру рецепторного розчину підтримували на рівні 37°С і перемішували за допомогою магнітної мішалки. Мембрани встановлювали між рецепторними та

донорними осередками. Поверхня, що піддавалася дифузії, становила  $2,54 \text{ см}^2$  (діаметр 1,8 см), а обсяг рецепторних осередків становив  $6 \text{ см}^3$ . Зверху донорні осередки покривали пластиковою плівкою. Систему врівноважували при  $37^\circ \text{C}$  протягом 2 годин до кожного експерименту.

Осередки-донори заповнювали 5 мл Revalife. Зразки (N=3) відбирали з інтервалами в 24-48 годин, брали 200 мкл зразків рецепторних розчинів і замінювали свіжим буфером; експерименти проводилися в трьох повторах. Кількість НАГ, який проник через «шкіру», визначалася за допомогою методу високоефективної аніонообмінної хроматографії з імпульсним амперометричним детектуванням (ВЕАХ-ИАД).

Глюкозамін, що здатний проникати через модельну мембрану, був проаналізований в Центрі по дослідженню комплексних вуглеводів Університету Джорджії, США. Була використана ВЕАХ-ИАД (Dionex, Санта-Кларита, Каліфорнія, США) в системі Dionex DX-500, що складається з градієнтного насоса Р40, електрохімічного детектора ED40, Автосамплера AS3500 і робочої станції для хроматографії PeakNet. Апарат ВЕАХ-ИАД був оснащений аналітичної аніонообмінною колонкою CarboPac™ PA20 (3×150 мм) для швидкого поділу з високою роздільною здатністю моносахаридів і дисахаридів з використанням імпульсного амперометричного детектування, аналітичної захисної колонки CarboPac PA20 (3×30 Мм) і карбонатної предколонки (25×15 мм). У мобільній фазі (А) використовували дегазовану і деіонізовану воду. У рухомій фазі (Б) використовували 0,02 Н NaOH, приготований на деіонізованій воді і пропущений через фільтри 0,45 мкм в апараті для фільтрації розчинника (Waters-Millipore, Мілфорд, Массачусетс, США), який дегазували під вакуумом. Мобільна фазова система працювала при градієнтній концентрації 16 мМ NaOH при швидкості потоку 0,5 мл / хв. Стандартна калібрувальна крива для НАГ (рис. 3.1 та 3.2) була отримана з лінійної регресією ( $R^2 = 0,9936$ ). Кожен набір зразків виконувався з використанням зовнішніх стандартів. Значення концентрації зразка були отримані за допомогою програмного забезпечення Peak Net. Ці значення порівнювалися з даними, отриманими при розрахунках площі піку і висоти піку, які спостерігаються як функції лінійного рівняння регресії стандартної кривої.

Стационарний стан потоку ( $J_{ss}$ ) для НАГ ( $\text{мг}/\text{см}^2/\text{ч}$ ) або ( $\text{мкг}/\text{см}^2/\text{ч}$ ) розраховувалася по збільшенню кількості глюкозаміну в рецепторному середовищі [34]. Коефіцієнт проникності НАГ ( $k_p$ ) в  $\text{см}/\text{год}$  розраховувався по відомим фізико-хімічним параметрам [35]. Експериментальні коефіцієнти проникності НАГ ( $K_p$ ) в  $\text{см}/\text{год}$  визначалися розподілом  $J_{ss}$  на кумулятивну концентрацію в донорних осередках. Час затримки ( $t_{lag}$ ) визначалося графічно за кумулятивним кількості глюкозаміну з Revalife™, що виділяється на одиницю площі ( $\text{мг}/\text{см}^2$ ) або ( $\text{мкг}/\text{см}^2$ ) в залежності від часу (h). Для контролю швидкості вивільнення глюкозаміну *in vitro* ( $\text{мг}/\text{см}^2$ ) або ( $\text{мкг}/\text{см}^2$ ) визначали залежність квадратного кореня показника часу ( $t_{1/2}$ ) від кумулятивної кількості лікарського засобу, що вивільняється на одиницю площі ( $\text{мг}/\text{см}^2$ ) або ( $\text{мкг}/\text{см}^2$ ). [36] Всі дані були представлені відповідно до галузевих протоколів керівництва Управління з контролю якості харчових продуктів і медичних препаратів США (FDA) [37].

## 5. Висновок

Застосування глюкозаміну дає надію пацієнтам з остеоартритом (ОА), оскільки в ряді розглянутих наукових досліджень було показано, що він полегшує симптоми болю і запалення, пов'язані з ОА. Найбільш важливим є те, що він охороняє суглоби від подальшого погіршення їх стану. У кількох дослідженнях було показано, що глюкозамін не тільки сприяє поліпшенню стану суглобів, але також інвертує протікання ОА. Національні інститути здоров'я США (National Institutes of Health) в даний час проводять тривале багаточентрове дослідження, назване Glucosamine / Chondroitin Arthritis Intervention Trial (GAIT; дослідження застосування глюкозаміну / хондроїтину при артритах). Його результати планується отримати восени 2005 року. У ранніх звітах було вказано, що це дослідження в значній мірі підтвердить переваги ОА щодо глюкозаміну, описані в публікаціях про попередніх дослідженнях.

Однак ефективність глюкозаміну при лікуванні ОА значно обмежена доступними методами його введення в організм. В даний час глюкозамін продається у вигляді таблеток, капсул, порошків, напоїв, кремів і гелів. На жаль, лише менше 1% перорально введених доз досягають суглобів. Глюкозамін у складі сучасних кремів і гелів не проникає через шкіру. Отже, в той час як методи

пероральної доставки можуть забезпечити достатню кількість глюкозаміну для деяких осіб з легкою формою ОА, вони не забезпечують достатньої кількості для страждаючих ОА з більш серйозними проблемами.

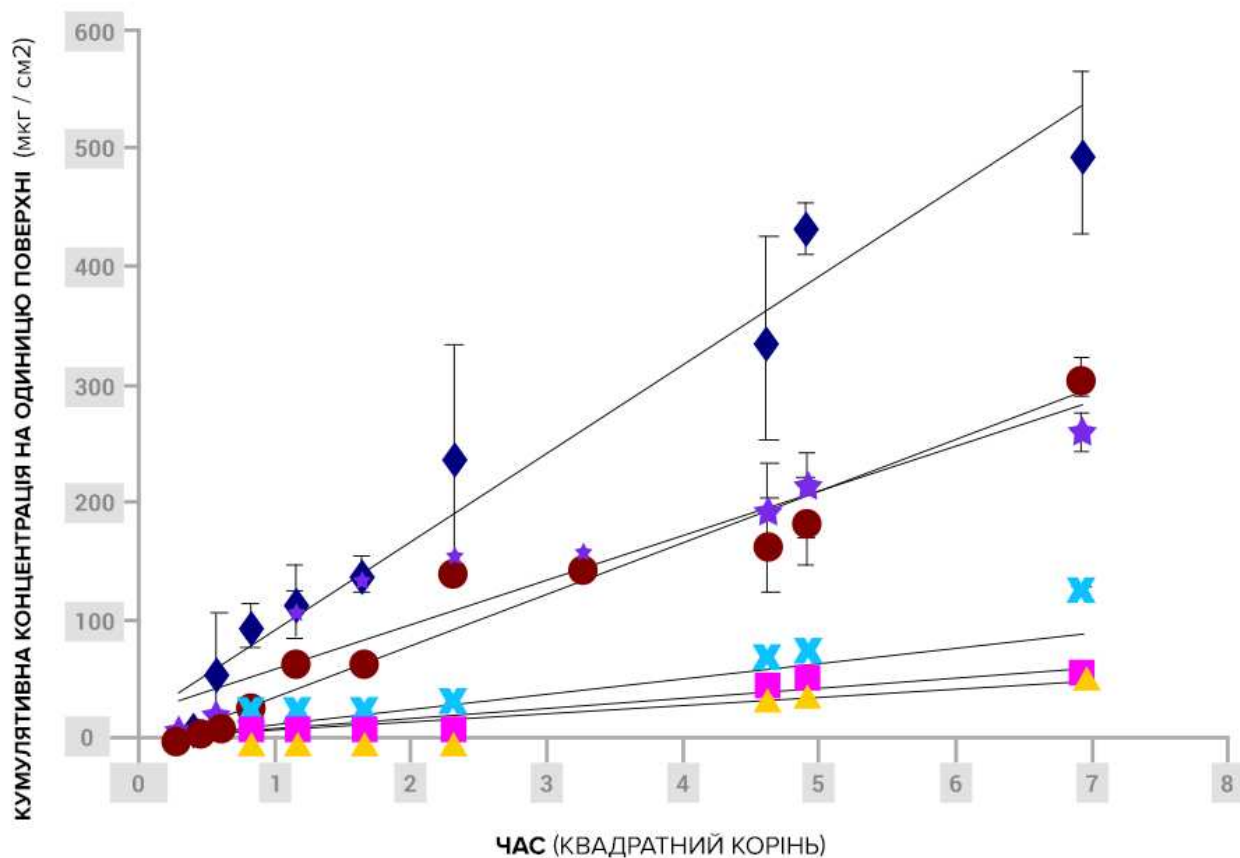
Дослідження *in vitro* продемонстрували, що молекула глюкозаміну в складі Revalife™, метаболіт глюкозаміну, володіє чудовою властивістю проникати через мембрани шляхом трансдермального транспорту та/або черезшкірного всмоктування.

Препарат III А показав найкращі швидкість вивільнення, стаціонарний стан потоку і коефіцієнт проникності, (табл. 1). Дані показують хороші результати проникності як для III А, так і для III Б. Однак швидкості вивільнення препаратів II Б і III Б є порівнянними. Для порівняння,  $J_{ss}$  і коефіцієнт проникності НАГ значно вище для речовини-носія III А, ніж для III Б. Спрощене графічне порівняння отриманих фізико-хімічних даних показано на **рисунок 3.1 та 3.2**. Виходячи з цих даних, розробили оптимальну лікарську форму Revalife™, показники для якої були можна порівняти з показниками для II Б, III Б і III А.

Площа «шкіри» в модельній системі набагато менше, ніж у середня площа шкіри людини, що покриває суглоб. Тому екстраполяція даних, отриманих для Revalife™, дає набагато більший, ніж 15 мг, потенціал проникнення глюкозаміну в шкіру. Це стосується швидкості вивільнення речовини і величини  $J_{ss}$ . Оптимальна форма, III А, дає швидкість стабільного вивільнення 10,3 мг/см<sup>2</sup>/ год. Кількість 15 мг еквівалентно 1%, що отримується при дозуванні 1500 мг пероральних препаратів глюкозаміну, прийнятих 4 рази на день. Проблема в тому, що набагато менше 1% при такій щоденній дозі досягає суглоба. Висновок полягає в тому, що для колінного суглоба використовується буквально один грам препарату Revalife, що містить 100 мг молекули глюкозаміну. Протягом двох годин понад 99% ± проникнуть через шкіру. Таким чином, доставка речовини до суглобу, ураженого ОА, перевищить 15 мг, еквівалентних прийому в дозі 1500 мг 4 рази на день оральних препаратів глюкозаміну у вигляді порошків, таблеток, напоїв і т. д.

**Таблиця 1. Фізико-хімічні дані, отримані для проникнення молекули глюкозаміну при використанні Revalife™**

	$J_{ss}$ (mg/cm <sup>2</sup> /h)	Швидкість вивільнення (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. Фізико-хімічні дані, отримані для проникнення глюкозаміну в складі Revalife™ з різних оптимальних / неоптимальні носіїв. Кумулятивна концентрація (n=3) на одиницю поверхні ± стандартне відхилення в залежності від квадратного кореня часу.

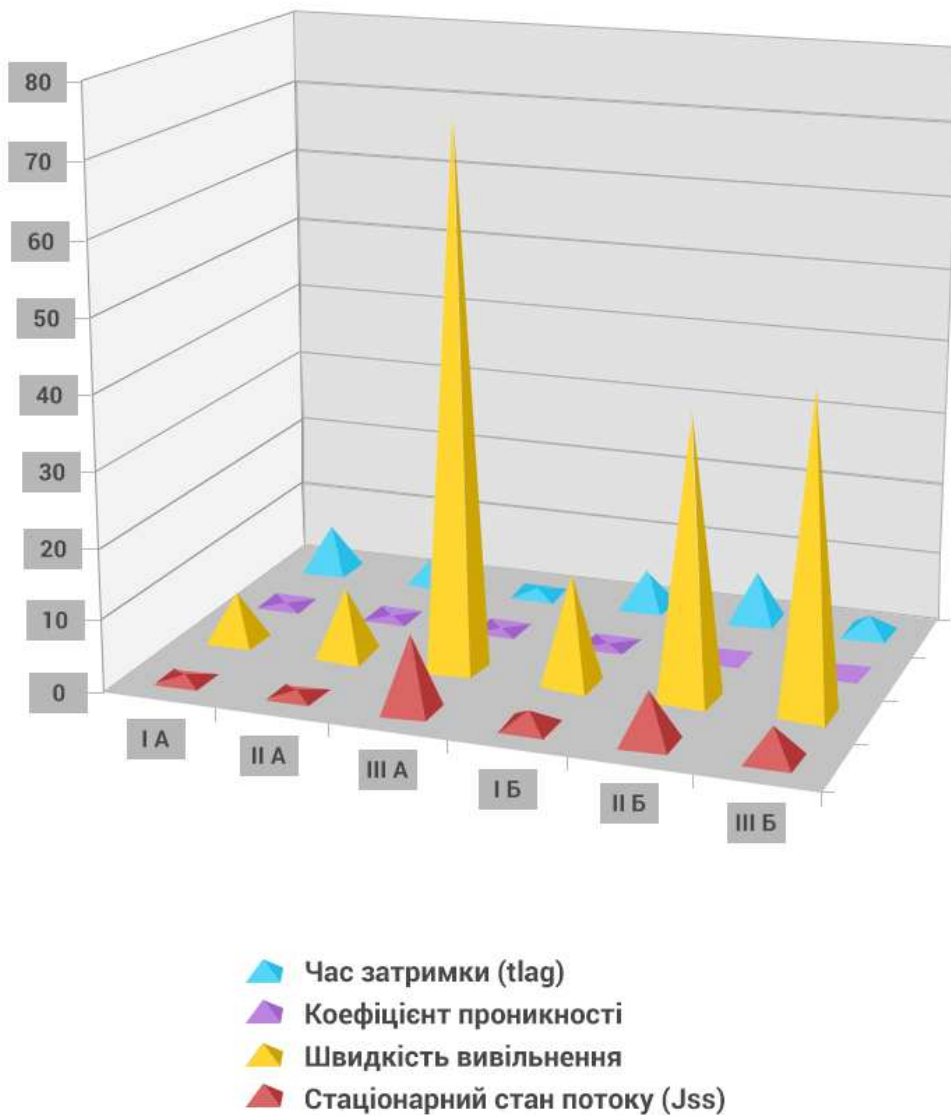


Рисунок 3.2. Графічне порівняння фізико-хімічних даних, отриманих для проникнення НАГ.

## 6. Література

- 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-Organo-Gel 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.