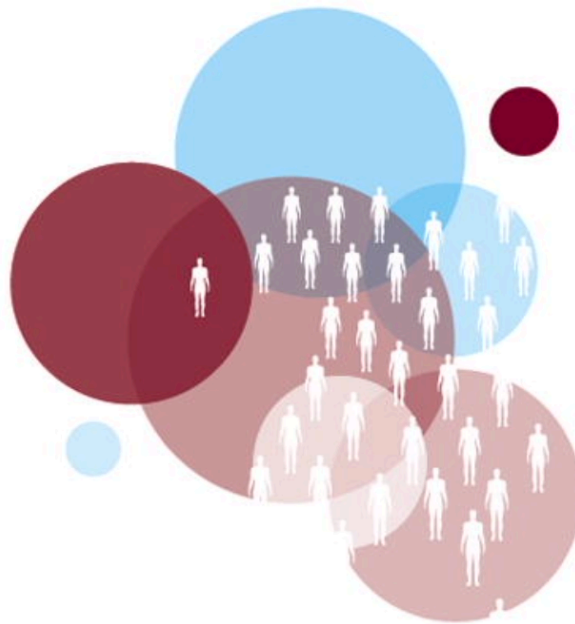




VOLUME 33 ISSUES 3-4 OCTOBER 2009 ISSN 1877-7821

# cancer EPIDEMIOLOGY

The International Journal of  
Cancer Epidemiology, Detection and Prevention



AN EJC PUBLICATION



## Эпидемиология рака

Международный журнал эпидемиологии, обнаружения и профилактики рака

journal homepage: [www.cancerepidemiology.net](http://www.cancerepidemiology.net)



### Влияние активного соединения, коррелирующего с гексозой, на модуляцию выпадения волос, вызванного цитозинарабинозидом, и повреждения печени, вызванного 6-меркаптопурином и метотрексатом, у грызунов

Buxiang Sun<sup>a</sup>, Koji Wakame<sup>a</sup>, Eri Sato<sup>a</sup>, Hiroshi Nishioka<sup>a</sup>, Okezie I. Aruoma<sup>b,\*</sup>, Hajime Fujii<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Amino Up Chemical Co., Ltd., 363-32 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo 004-0839, Japan

<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Touro College of Pharmacy, 230 West 125th, New York, NY 10027, USA

#### Информация о статье

##### История статьи:

Принято 20 июля 2009 г.

##### Ключевые слова:

Активное коррелированное соединение гексозы (АНСС)  
6-меркаптопурин  
Метотрексат  
Цитозин арабинозид  
Алопеция (выпадение волос)  
Медикаментозное поражение печени  
Противораковые препараты  
Побочные эффекты химиотерапии рака  
Дополнительная медицина  
Экономика терапии рака

#### Аннотация

Активное коррелированное соединение с гексозой (АНСС) (смесь полисахаридов, аминокислот, липидов и минералов, полученных из культивируемого мицелия гриба Basidiomycete, *Lentinula edodes*) использовали для оценки улучшения состояния при алопеции (выпадении волос), вызванной цитозинарабинозидом (Ага-С), и модулирование повреждения печени, вызванного однократным приемом 6-меркаптопурина (6-МР) в сочетании с метотрексатом (МТХ).

**Методы:** Целостность фолликулов и рост волос оценивали у самцов и самок новорожденных крыс SD (в возрасте 8 дней), получавших однократную дозу Ага-С (30 мг/кг/день, внутривентриально) и АНСС (500 мг/кг/день, внутривентриально) в течение 7 дней подряд. Были оценены побочные эффекты однократной пероральной дозы 6-МР (2,5 мг/кг массы тела) плюс метотрексат (30 мг/кг массы тела) и их улучшение при лечении АНСС (1000 мг/кг массы тела) в течение 28 дней у самцов мышей ddY (возраст 8 недель).

**Результаты:** у 71,4% крыс, получавших Ага-С, наблюдалась тяжелая алопеция, а у 28,6% — умеренная алопеция. Тем не менее, группа Ага-С, получавшая АНСС, была значительно защищена от алопеции. Крысы, получавшие Ага-С, имели глубокую потерю волосяных фолликулов, но группа, получавшая Ага-С плюс АНСС, имела умеренную потерю фолликулов.

Добавка АНСС мышам, получавшим 6-МР и МТХ, значительно увеличила массу, эритроциты, лейкоциты и сывороточный альбумин, улучшила гипертрофию и дегенерацию печени, нормализовала в организме мышей активность (sGOT) сывороточной глутаминовой щавелевоуксусной трансминазы и (sGPT) сывороточной глутаминовой пировиноградной трансминазы, а так же усиленные ферменты печени, метаболизирующие лекарственные средства. **Вывод:** совместное введение АНСС значительно уменьшило побочные эффекты, связанные с Ага-С, 6-МР и МТХ. Однако молекулярный механизм активности АНСС и его клиническая пригодность для использования нуждаются в определении.

\* Соответствующие авторы.

Адреса электронной почты: [okezie.aruoma@touro.edu](mailto:okezie.aruoma@touro.edu) (О.И. Аруома),

[hfujii@aminoup.co.jp](mailto:hfujii@aminoup.co.jp) (Х. Фуджи).

## 1. Введение

Химиотерапия больных любым видом рака остается эффективным методом лечения заболевания, но она связана со многими побочными эффектами, включая легкую или ограничивающую дозу токсичности, алопецию (выпадение волос), миелосупрессию, желудочно-кишечные дисфункции, неврологические изменения, а так же иммунную недостаточность. Хотя экономический анализ лечения в системах здравоохранения может применяться ко всему спектру вмешательств, составляющих именно онкологическую службу (включая программы скрининга рака и раннее лечение, диагностические тесты и процессы направления к специалистам, хирургические процедуры, лучевую терапию, химиотерапию и паллиативную помощь) [3,4], экономическое воздействие рака на системы здравоохранения по-прежнему требует особого внимания в контексте комплементарной медицины.

Цитозинарабинозид (специфичный цитарабин, Ага-С, для клеточного цикла цитотоксический препарат, который избирательно убивает клетки в S-фазе) использовался для лечения острого миелобластного и лимфобластного лейкоза человека, некоторых видов рака головы, шеи и неходжкинской лимфомы (НХЛ).

Его эффективность связывают с цитотоксическими эффектами на предшественников бластов при самообновлении [5–10]. Спящие лейкемические предшественники бластов рекрутируются в ответ на стимуляцию роста гемопоэтическими факторами роста, которые не только стимулируют их рост, но и обеспечивают чувствительность к Ага-С [5,6]. Ага-С вызывает различные побочные эффекты, такие как утомляемость, потеря аппетита, диарея, боль во рту, тошнота и рвота, угнетение костного мозга и алопеция (выпадение волос) [7–10].

Кожная или дерматологическая токсичность (которая может проявляться в различных формах и иногда вызывать токсичность, ограничивающую дозу) может привести к десенсибилизации иммунной системы, что приводит к выработке веществ, провоцирующих приступ алопеции (например, лейкоциты атакуют волосные фолликулы, так как они принимают их за инородные тела) [11–15].

В результате химиотерапевтического воздействия на пролиферирующие клетки в волосных фолликулах могут быть ослаблены волосы или даже полная потеря формирования волосного стержня. Хотя это, как правило, обратимо, алопеция считается одним из наиболее опасных побочных эффектов химиотерапии [12–18].

Метотрексат (МТХ) и 6-меркаптопурин (6-МР) используются при лечении острого лимфобластного лейкоза и других злокачественных новообразований [19–24].

Однако мутации в гене тиопуринометилтрансферазы (ТРМТ) оказывают сильнейшее влияние на переносимость 6-МР и интенсивность дозы при поддерживающей терапии острого лимфобластного лейкоза у детей [25–27].

МТХ и его длинноцепочечные полиглутаматные формы действуют путем ингибирования синтеза пуринов *de novo*, активности дигидрофолатредуктазы и синтеза тимидилатов. Цитотоксическое действие

метотрексата не избирательно в отношении раковых клеток и влияет на нормальные ткани, обладающие высокой скоростью пролиферации, в том числе на гемопоэтические клетки костного мозга и активно делящиеся клетки слизистой оболочки кишечника [19–24,28], 6-МР превращается в активные метаболиты, 6-тиогуаниновые нуклеотиды (6-TGN), посредством ряда ферментативных стадий с участием гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (НРРТ), инозинмонофосфатдегидрогеназы и гуанозинмонофосфатсинтазы [29].

6-МР также может быть преобразован в 6-метилтиоинозин-50-монофосфат конкурирующими путями, катализируемыми как ТРМТ, так и НРРТ. Активные метаболиты (6-TGN) действуют как антагонисты пуринов, которые препятствуют синтезу нуклеиновых кислот, подавляя рост этих клеток. Считается, что иммунодепрессивные свойства 6-МП частично опосредованы их цитотоксическими эффектами в лимфоидных клетках [29].

Наиболее важными цитотоксическими метаболитами метотрексата и 6-МП являются полиглутаматы метотрексата и 6-ТГН [29–31] соответственно.

6-МП и некоторые его метаболиты, катализируются тиопуринометилтрансферазой с образованием метилированных метаболитов, некоторые из которых являются сильными ингибиторами синтеза пуринов *de novo*. Длительное введение препарата может вызвать накопление полиглутаматов метотрексата, в то время как снижение уровня фолиевой кислоты может само по себе накапливаться до высоких уровней и способствовать гепатотоксичности, вызванной метотрексатом (в основном из-за более длительного внутриклеточного присутствия данного препарата) [22,24].

6-МР и метотрексат являются метаболическими антагонистами, которые конкурируют за метаболизм пуриновых оснований и фолиевой кислоты соответственно. Хотя это и не является частью этого исследования, можно утверждать, что АНСС может защищать метаболизм пуринов и фолиевой кислоты, тем самым нормализуя пролиферацию гепатоцитов и, следовательно, модулируя повреждение печени, вызванное совместным введением 6-МП и МТХ.

Полимеры глюкозы, полученные из клеточной стенки пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisia*) - б-глюканы, обладают признанными биологическими эффектами, которые, как правило, включают противомикробную и противопаразитарную активность [32,33], а также ингибирование развития опухолей, оказание радиозащитного действия, улучшая заживление ран [34,35], вызывая иммунные реакции [36,37], а так же высвобождая метаболиты арахидоновой кислоты [38,39], стимулируя важные кровяные и обладая антиоксидантными функциями [40].

Активное соединение, коррелирующее с гексозой (АНСС), представляет собой смесь 71,2% углеводов, включая полисахариды, 13,1% белков, 8,9% минералов, 2,2% липидов, 2,1% пищевых волокон и 2,5% других веществ, включая воду, полученную из культивируемого мицелия гриба базидиомицета. Состав а- и б-глюканов в АНСС составляет 15,8 г/100 г и 0,2 г/100 г соответственно, что определяет его уникальность как функциональной добавки к пище. Действительно, АНСС участвует в модуляции иммунных функций и играет защитную роль против инфекции [41–44]. В исследованиях на животных (с использованием мышей C57BL/6) лечение АНСС значительно замедляло развитие опухоли после инокуляции линии клеток меланомы B16F0 или линии клеток лимфомы EL4 [43]. АНСС усиливал как антиген - (Ag) - специфическую активацию, так и пролиферацию CD 4 (+) и CD 8 (+) Т-клеток. Увеличивал количество опухолевых Ag-спец. CD8 (+) Т-клеток и, что более важно, увеличивал частоту опухолевых Ag-специфический гамма-интерферон, продуцирующей CD8(+) Т-клетки [43]. Лечение АНСС имело тенденцию к увеличению количества клеток NK и гамма-дельта Т-клеток, что указывает на то, что роль АНСС может заключаться в активации этих врожденных лимфоцитов [43]. В клинических условиях АНСС улучшил прогноз пациентов с раком печени (гепатоцеллюлярной карциномой) после хирургического лечения [35], продлил выживаемость и улучшил прогноз пациентов с распространенными раками печени [45]. АНСС улучшил прогноз пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой после хирургического лечения [35].

С точки зрения безопасности АНСС хорошо переносится организмом и практически не вызывает побочных эффектов [42,46] у крыс с LD50 (п.о.) 8490 мг/кг (у самцов крыс) и 9849 мг/кг (у самок крыс). Минимальная летальная доза (перорально и внутрибрюшинно) АНСС составила 7430 мг/кг у самцов крыс и 8340 мг/кг у самок крыс.

Влияние АНСС на выпадение волос, вызванное Ага-С, у новорожденных крыс и влияние АНСС на повреждение печени, вызванное 6-МР и МТХ, у взрослых мышей исследовали в поддержку текущих исследований, которые были направлены на определение механизмов и биологической основы для деятельности АХЦ.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. АНСС

АНСС (рис. 1) (Amino Up Chemical Co., Ltd., Саппоро, Япония) экстрагируют из мицелия гриба базидиомицета *Lentinula edodes* [47].

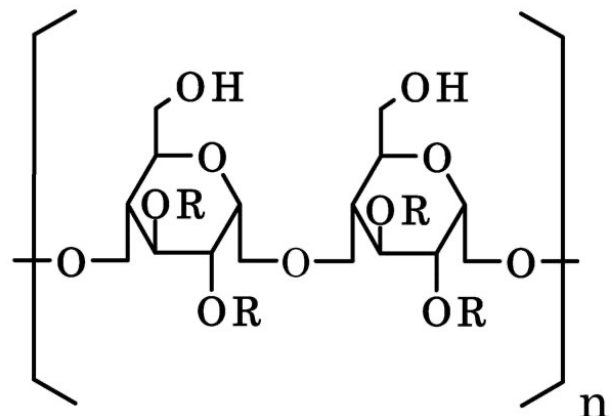
Активные ингредиенты в АНСС включают а-глюкан, содержащий ацетилированную форму, и б-глюкан, причем последний является одним из основных активных ингредиентов, содержащихся во многих видах грибов.

Ацетилированная молекула а-глюкан (олигосахарид, полученный в процессе культивирования грибов базидиомицетов) имеет низкую молекулярную массу 5000 Da, что делает его легко всасываемым в кишечнике.

Состав а- и б-глюканов в АНСС составляет 15,8 г/100 г и 0,2 г/100 г соответственно.

### 2.2. Животные и лечение

Цитозинарабинозид, 6-меркаптопурин и метотрексат были получены от Sigma-Aldrich Japan (Токио, Япония). Самцов и самок новорожденных крыс SD (в возрасте 8 дней) (CLEA Japan Inc., Токио, Япония) использовали для оценки выпадения волос в этом исследовании главным образом потому, что они находятся на пике быстрой клеточной пролиферации и развития и, следовательно, являются хорошей моделью для оценки целостности фолликулов и рост волос.



**α-1,4 Glucan (R: H or CH<sub>3</sub>CO-)**

**Рис. 1.** Структура основного действующего вещества АНСС. АНСС состоит из 71,2% углеводов, включая полисахариды, 13,1% белков, 8,9% минералов, 2,2% липидов, 2,1% пищевых волокон и 2,5% других веществ, включая воду. Полисахаридный состав представляет собой а-глюкан, ацетилированный а-глюкан и б-глюкан. Основными веществами являются а-глюкан и ацетилированный а-глюкан.

Крысы были случайным образом разделены на пять групп (таблица 1) следующим образом: группа 1, получавшая внутрибрюшинно физиологический раствор;

2-я группа, Ага-С (30 мг/кг/сут, внутрибрюшинно);

3 - группа, Ага-С и АНСС (500 мг/кг/день, перорально);

4 - группа: Ага-С и АНСС ( 500 мг/ кг/ сут, внутрибрюшинно);

Группа 5, Ага-С и АНСС (концентрация 5%,местно на кожу спины). Раствор Ага-С вводили через 1 ч после введения раствора АНСС (партия 83-0310). Все группы лечили в течение 7 дней подряд.

Степень выпадения волос и волосяные фолликулы в биоптатах кожи оценивали через 5 дней после последней обработки.

Степень алопеции была разделена на четыре степени: степень 1 с выпадением волос 0–25%; 2 степень с выпадением волос на 25–50%; 3 степень с выпадением волос на 50–75%; 4 степень с 75–100% выпадением волос.

Таблица 1

Степень алопеции модели новорожденных крыс, получавших Ага-С или Ага-С плюс АНСС.

Group	n	Alopecia grade <sup>a</sup>			
		1	2	3	4
Control	3	3	0	0	0
Ara-C	7	0	1	1	5
Ara-C + ARCC (p.o.)	9	4	2	2	1
Ara-C + АНСС (i.p.)	10	1	5	2	2
Ara-C + АНСС swabbing	10	3	3	2	2

<sup>a</sup> 1 = 0–25%; 2 = 25–50%; 3 = 50–75%; 4 = 75–100% алопеция

Для исследований с участием 6-МП и МТХ 24 самца мышей ddY (8-недельного возраста), приобретенных у Japan SLC, Inc. (Намаматсу, Япония), разделили на четыре группы (по 6 мышей в каждой группе). Группа 1 получала воду в течение 28 дней; 2-я группа получала раствор АНСС (10 мл/кг массы тела 100 мг/мл АНСС (лот. 95-0125), 1000 мг/кг массы тела) в течение 28 дней; Группа 3 получала разовую дозу 6-МП (2,5 мг/кг массы тела) и МТХ (30 мг/кг массы тела) перорально с последующим лечением водой в течение 28 дней; Группа 4 получала однократную дозу противоопухолевых препаратов (как и в группе 3) с последующим введением АНСС (1000 мг/кг массы тела) через зонд в течение 28 дней. Было показано, что АНСС оказывает благотворное влияние на рак и инфекционные заболевания в диапазоне доз 100–1000 мг/кг у грызунов [43,44,48], поэтому для новорожденных крыс и мышей были выбраны дозы 500 и 1000 мг/кг соответственно.

Все животные, которые были использованные в настоящем исследовании, содержались в помещении с контролируемой температурой и влажностью при 23°C и 55–60% соответственно при 12-часовом цикле свет-темнота (свет включен с 08:00 до 20:00), и им давали стандартный гранулированный корм для грызунов (CE-2; CLEA Japan Inc.) и воду без ограничений. Эксперименты на животных были одобрены Комитетом по уходу за животными Amino Up Chemical Co., Ltd.

### 2.3. Анализ биохимический и биологический.

#### Методы

В исследовании лечения 6-МП и метотрексатом животных умерщвляли на 28-й день, а тело и органы (печень и селезенку) взвешивали. Эритроциты крови (эритроциты) и лейкоциты (лейкоциты) были подсчитаны, а химические вещества сыворотки, связанные с функцией печени, такие как общий белок, триглицерид альбумина, sGOT и sGPT, были измерены с использованием коммерческих наборов для анализа (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Осака, США). Япония).

Ферменты печени, которые метаболизируют лекарственные средства, такие как:

цитохром P450,

глутатион-S-трансфераза (GST),

арилгидрокарбогидроксилаза (АНН),  
 п-нитрофенолгидроксилаза (PNPH)  
 пентоксирезорурфин-о-деалкилаза (PROD),  
 оценивались по существу, как описано в Omiga. и другие. [49], Habig и соавт. [50], Dehnen и соавт. [51] и Lubet et al. [52]. При гистопатологическом исследовании залитые парафином срезы (толщиной 4 мм) окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) после фиксации тканей мышей в 10% забуференном формалине и наблюдали за результатом под световым микроскопом.

### 3. Статистический анализ

Представленные данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение и были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Защищенное наименьшее значимое различие Фишера (PLSD) использовалось в качестве апостериорного теста, и значения *p* менее 0,05 считались статистически значимыми.

### 4. Результаты

Оценивали влияние АНСС на вызванное Ага-С выпадение волос у новорожденных крыс (таблица 1). Были оценены три пути введения: перорально, внутривентриально и местно. Актуальное приложение было предназначено для разработки нового использования. Все новорожденные крысы были голыми на дату начала эксперимента (день 0). Однако волосы на коже у контрольных крыс начали расти через 2 или 3 дня, а контрольные крысы были полностью покрыты волосами на теле через 12 дней после начала исследования.

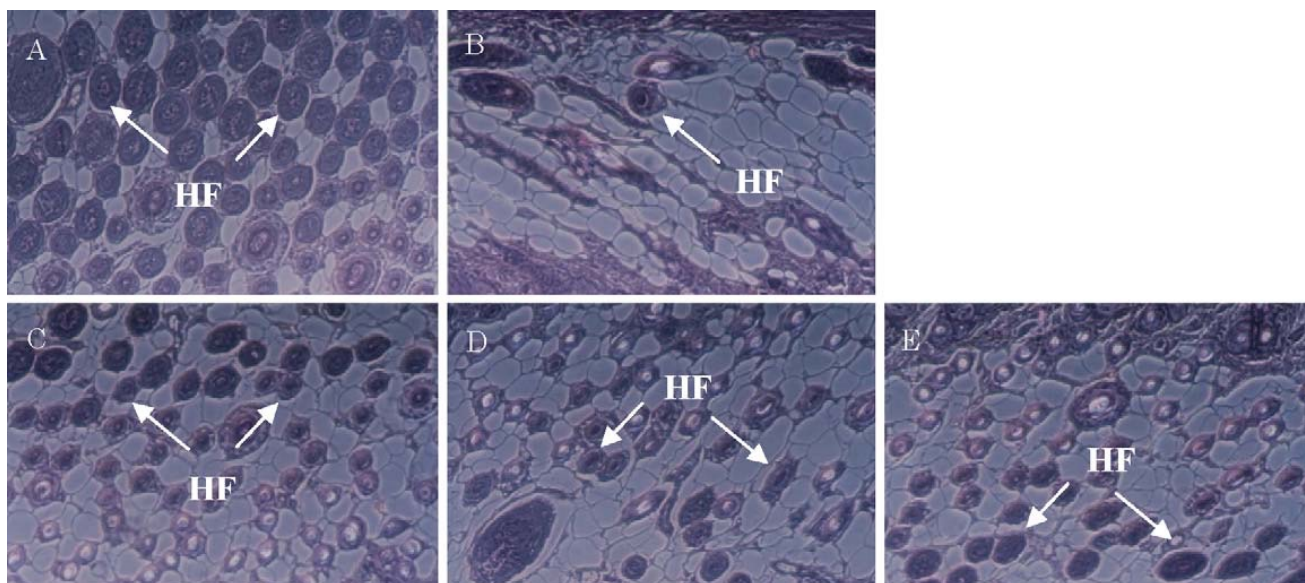
Из семи крыс, получавших только Ага-С, у пяти из них наблюдалась тяжелая алопеция (выпадение волос на 75–100%), а у двух животных наблюдалась умеренная алопеция (выпадение волос на 25–75%). Однако все группы, получавшие АНСС, были явно защищены от алопеции.

В частности, животные, получавшие Ага-С в сочетании с АНСС (перорально), показали наиболее эффективную защиту. У четырех из девяти крыс была только легкая алопеция (выпадение волос 0–25%).

Местное введение препарата АНСС также с успехом продемонстрировало относительно сильное улучшение в отношении выпадения волос, вызванного Ага-С.

Визуальный осмотр показал ингибирование роста волос у новорожденных крыс, получавших Ага-С, по сравнению с необработанными контрольными крысами (дополнительные данные).





**Рис. 2.** Биопсия кожи волосяных фолликулов крыс, получавших Ага-С или Ага-С плюс АНСС (100). Новорожденным крысам вводили носитель (контроль, А), только Ага-С (В), Ага-С + АНСС (перорально) (С), Ага-С + АНСС (внутрибрюшинно) (D) и Ага-С + АНСС. (мазок) (Е) в течение 7 дней подряд. Волосяные фолликулы исследовали с помощью биопсии кожи на 12-й день. Это репрезентативные фотографии каждой группы. ВЧ: волосяной фолликул (!).

	Контрольная	АНСС	6-MP + MTX	6-MP+MTX+АНСС
Прибавка массы тела на 28 день	5.44 ± 0.99	4.74 ± 2.86	-3.20 ± 1.28	2.24 ± 1.40 **
Масса печени/тела %	5.02 ± 0.30	4.88 ± 0.16	5.37 ± 0.13	4.66 ± 0.22 **
Масса селезенки/тела %	1.67 ± 0.15	1.49 ± 0.17	1.61 ± 0.113	1.67 ± 0.18 *
RBC (x10 <sup>4</sup> )	685 ± 65	688 ± 71	237 ± 64	486 ± 44 *
WBC (x1000)	78 ± 17	76 ± 10	26 ± 8	46 ± 8 **
Сыворотка общего белка (г/дл)	635 ± 0.27	6.88 ± 0.30	5.38 ± 0.62	6.04 ± 0.27
Сывороточный альбумин (г/дл)	3.58 ± 0.30	287 ± 0.26	29.5 ± 0.22	3.87 ± 0.21 *
A/G	1.29 ± 0.14	1.29 ± 0.10	1.30 ± 0.12	1.80 ± 0.16
Триглицерид сыворотки (г/дл)	151.9 ± 41.3	160.8 ± 37.2	52.4 ± 18.9	102.5 ± 30.6
Цитохром P450 (ммоль/мг)	0.55 ± 0.02	0.62 ± 0.07	0.25 ± 0.11	0.60 ± 0.09 **
GST (ммоль/мг)	49.3 ± 8.1	58.9 ± 7.4	42.3 ± 5.6	56.8 ± 6.5 *
АНН (контрольный %)	100.0 ± 23.0	100.7 ± 32.1	43.4 ± 20.0	107.3 ± 27.2 **
PNPH (контрольный %)	100.0 ± 33.2	111.1 ± 31.3	43.8 ± 21.7	94.0 ± 10.8 **
PROD (контрольный %)	100.0 ± 19.8	91.0 ± 37.0	22.6 ± 4.9	67.0 ± 24.2 **
Морфология печени	норма	норма	некроз	легкая дистрофия

GST: глутатион-S-трансфераза; АНН: арилгидрокарбонгидроксилаза; PNPH: п-нитрофенолгидроксилаза; PROD: пентоксизезорурфин-о-деалкилаза. Значения представляют собой среднее значение SD для шести мышей в каждой группе.

\*Статистическая значимость отличий от группы, получавшей 6-MP + MTX, указана при p < 0,05.

\*\*Статистическая значимость отличий от группы, получавшей 6-MP + MTX, указана при p < 0,01.

Исследование биоптатов кожи показало глубокую потерю волосяных фолликулов у крыс, получавших Ага-С, так что в поле зрения под световым микроскопом было меньше фолликулов (рис. 2). Однако в группе, получавшей Ага-С плюс АНСС, наблюдалась только легкая потеря фолликулов, и, в частности, потеря волосяных фолликулов была заметно подавлена в группе АНСС (п.о.). Кроме того, АНСС улучшал снижение массы тела, вызванное лечением Ага-С. При измерении массы тела всех групп в последний день эксперимента с Ага-С (12-й день) средний вес контрольных крыс и крыс, получавших Ага-С, составил 19,5 x 1,5 г и 14,8 x 2,5 г соответственно, и была достоверная разница ( $p < 0,05$ ). С другой стороны, средний вес крыс, получавших совместное лечение АНСС (перорально, внутривенно и местно), составлял  $17,5 \pm 3,3$  г,  $15,9 \pm 2,6$  г и  $17,0 \pm 1,6$  г соответственно, и, в частности, вес тела АНСС (перорально) группа значительно улучшилась по сравнению с группой, получавшей только Ага-С ( $p < 0,05$ ).

Лечение только АНСС не показало каких-либо существенных изменений в измеренных показателях по сравнению с контролем (таблица 2).

Совместное лечение 6 - МП и метотрексатом приводило к очевидной потере массы тела и уменьшению количества эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови.

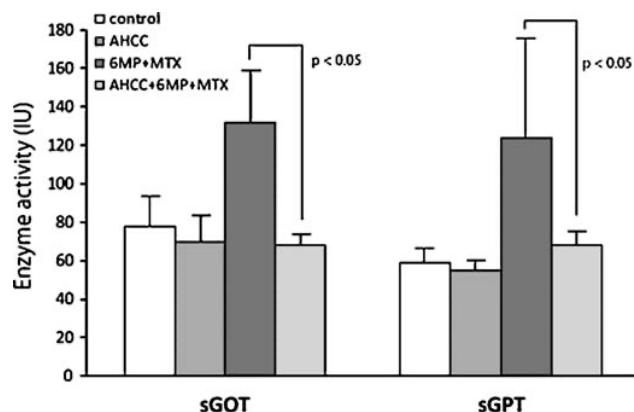
Кроме того, совместное лечение вызывало снижение количества полихроматических эритроцитов в клетках костного мозга.

Уровень общего белка и триглицеридов в сыворотке, а также активность ферментов метаболизма средств в печени (цитохром P450, GST, АНН, PNP и PROD) (табл2) снижались при лечении противоопухолевыми препаратами, однако масса печени мышей и уровень сывороточные трансаминазы (sGOT и sGPT) (рис. 3) были повышены. Морфология печени в группе совместного лечения 6-МП и метотрексатом показала явную вакуолярную дегенерацию и некроз в периферических лобулярных клетках (рис. 4) (этот феномен характерно индуцируется 6 - МП и метотрексатом). Эти изменения были значительно восстановлены и улучшены при совместном введении с АНСС. В частности, АНСС улучшал различные параметры, такие как масса тела (на 28-й день для экспериментов с 6-МП и МТХ), массу печени, массу селезенки, лейкоциты и эритроциты, sGOT и sGPT, сывороточный альбумин и все ферменты метаболизма лекарств. оценивали по сравнению с группой лечения противоопухолевыми препаратами со статистически значимой разницей (таблица 2).

Гистологическое исследование показало, что АНСС частично предотвращает вакуолярную дегенерацию и некроз, вызванные противоопухолевыми препаратами (рис. 4).

## 5. Дискуссия

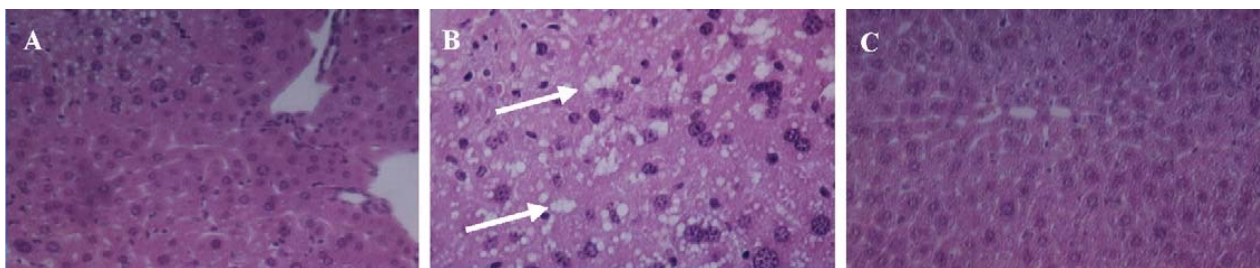
Используемые режимы химиотерапевтических агентов, являются цитотоксическими и воздействуют как на нормальные, так и на злокачественные клетки.



**Рис. 3.** Нормализация активности sGOT и sGPT при лечении АНСС. Самцов мышей ddY (в возрасте 8 недель) лечили водой (контроль), только АНСС, 6-МП + МТХ и АНСС + 6-МП + МТХ в течение 28 дней. Животных забивали для взятия крови, а затем измеряли уровень сывороточных GOT и GPT. Представленные данные означают среднее значение SD и были проанализированы с помощью ANOVA. Значения  $p$  менее 0,05 расценивались как статистически значимые.

Хотя противоопухолевые препараты с различными механизмами действия могут снижать тенденцию к потенциальной лекарственной устойчивости и, следовательно, позволяют использовать максимально переносимые дозы, химиотерапия также может применяться одновременно с лучевой терапией для усиления терапевтического эффекта [2].

Терапевтические эффекты зависят от различий в характеристиках, таких как радиочувствительность (некоторые опухоли содержат гипоксические клетки, которые являются источником радиорезистентности) и способность к восстановлению и репопуляции между нормальными и злокачественными тканями [2,53–55]. Обоснование одновременной химиотерапии и лучевой терапии включает способность цитотоксических агентов усиливать уничтожение опухолевых клеток, а так же ингибировать восстановление радиационных повреждений, вовлекать непролиферирующие клетки в клеточный цикл, сенсibilизировать гипоксические клетки индуцировать клеточную синхронизацию [56,57].



**Рис. 4.** Гистологическое сравнение морфологии печени. Печень у шести мышей каждой группы на 28-й день удаляли и фиксировали в течение ночи в 10% забуференном формалине. Залитые парафином срезы (толщиной 4 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином (HE) для гистопатологического исследования и наблюдали под световым микроскопом. Показанный здесь результат является репрезентативным для групп 6-МП + МТХ и 6-МП + МТХ + АНСС. (А) 6-МП + метотрексат (= 200), (В) 6-МП + метотрексат (= 400), разрушение клеток печени (отмечено стрелками: !), и (С) 6-МП + метотрексат + АНСС (= 400). 200).

Индукцированная метотрексатом токсичность, по-видимому, является следствием взаимодействия многих факторов: режима дозирования препаратов, продолжительности лечения заболевания, факторов риска пациентов, типа заболевания и наличия генетических и молекулярных факторов апоптоза [58]. Интерес здесь состоял в том, чтобы оценить преимущества биологической добавки АНСС в качестве диетического фактора после лечения Ага-С и комбинацией 6-МП плюс МТХ. Хотя не было значительного изменения в прибавке веса у мышей после лечения только АНСС, лечение 6-МП + МТХ привело к серьезной потере веса, которая была значительно смягчена добавлением АНСС. Лечение АНСС нормализовало активность sGOT и sGPT. Уровни цитохрома P450 и глутатион-S- трансферазы (GST) будут влиять на фармакокинетику препаратов противоопухолевых, будут определять их системные концентрации и, следовательно, токсичность (из-за снижения эффективности метаболизма фазы II). Лечение АНСС значительно повышало уровни GST и цитохрома P450.

Цетинер и др. [28] обнаружили, что таурин способен улучшать вызванное метотрексатом окислительное повреждение и модулировать иммунный ответ у крыс. Сеннер и др. [40] предприняли исследование, чтобы определить, может ли бета-глюкан улучшить окислительное повреждение органов, вызванное метотрексатом, и изменить иммунный ответ в контексте функций нейтрофилов, и пришли к выводу, что бета-глюкан благодаря своим антиоксидантным и иммунорегуляторным эффектам может иметь терапевтическую ценность. в облегчении апоптоза лейкоцитов, окислительного повреждения тканей и кишечных и гепаторенальных побочных эффектов, связанных с лечением метотрексатом. АНСС представляет собой пищевую добавку, полученную из грибов, около 70% ее компонентов представляют собой олигосахариды, содержащие структуры как а-, так и b-глюканов, и данные этого исследования свидетельствуют о ее биоэффективности в модуляции токсических эффектов цитотоксических препаратов (чей способ действие включает механизмы окислительного стресса и иммуномодуляции, а также снижение активности ферментов фазы II, метаболизирующих лекарственные средства). Однако еще предстоит установить, сопровождаются ли ингибирующие

эффекты 6-МП и МТХ на P450-зависимую активность и восстановление, вызванное АНСС, сопутствующими изменениями уровней белка и/или мРНК.

Собственная активность цитотоксических агентов и их применение в максимально переносимых дозах делают процедуру химиотерапевтического лечения пациентов высокорискованной [25]. Преимущества включения АНСС в стратегию химиотерапии могут позволить установить эффективную дозировку в клинической практике [48], что согласуется с интересом к экономике химиотерапии [3,4,59,60]. Кроме того, комбинация высоких доз метотрексата с внутривенным меркаптопурином превосходит низкие дозы метотрексата с меркаптопурином [61–63], но остается сомнительным, что высокие дозы метотрексата вызывают большее увеличение внутриклеточного накопления тиопурина по сравнению с низкими дозами метотрексата [61–63]. Мак и др. [65] обнаружили, что низкие дозы, еженедельное и подкожное введение метотрексата могут вызывать ремиссию у некоторых детей с болезнью Крона, которые не реагируют адекватно на другие иммуномодуляторы. Несоблюдение режима лечения метотрексатом и 6-МП при остром лимфобластном лейкозе у детей связано с риском рецидива [66–70].

Стойко низкий уровень аминотрансфераз может указывать на плохую приверженность лечению у пациентов, получающих стандартные дозы 6-МП. Добавки АНСС укрепляют, а так же оптимизируют возможности иммунной системы организма и могут сильно уменьшить побочные эффекты лучевой и химиотерапии, тем самым способствуя улучшению качества жизни пациентов (например, уменьшение тошноты, повышение аппетита и уменьшение беспокойства).

Потенциал того, что АНСС может уменьшить распространенность выпадения волос, был проведен на новорожденных крысах. Ага-С вводили крысам в течение 7 дней, чтобы вызвать выпадение волос. В то время как у животных, получавших Ага-С, наблюдалось сильное выпадение волос, крысы, получавшие Ага-С плюс АНСС, были более защищены.

Животные, получавшие Ага-С в сочетании с пероральным препаратом АНСС, показали наиболее эффективную защиту.



При химиотерапии токсические реакции на лекарства неизбежны, и их необходимо свести к минимуму. Таким образом, частота и тяжесть побочных эффектов, вызванных химиотерапией, и их лечение являются основными проблемами лечения. АНСС действительно смягчает побочные эффекты, связанные с химиотерапией рака. Будет важно определить в клинических испытаниях, позволяют ли достоинства АНСС онкологическим больным переносить терапевтические/высокие дозы цитотоксических препаратов и может ли это соответствовать улучшению качества жизни после химиотерапии. Предполагается, что стратегии добавок с участием АНСС могут значительно повысить экономическую эффективность медицинских вмешательств при лечении рака.

Пероральное введение смеси L - цистина / витамина B6 с диетой может быть эффективным химиопрофилактическим средством против вызванной дымом алопеции у мышей [17].

Алопеция, которая вызвана генотоксичными цитостатическими препаратами, характеризуется апоптозом и ядерными аберрациями как в экспериментальных [71], так и в клинических условиях [72].

Однако алопеция, вызванная доксорубицином [16] или циклофосфамидом [73,74], демонстрирует дистрофический катагенный паттерн.

Как курительная, так и лекарственная алопеция характеризуются резким усилением апоптоза в дистрофических фолликулах [17]. В нашем исследовании есть параллель с этой точкой зрения, где польза от вызванной лекарствами алопеции может быть скорректирована добавками АНСС.

Ясно, что необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить вклад пищевых добавок АНСС в защиту от побочных эффектов химиотерапии. Для новых пищевых добавок реальное доказательство эффективности должно по-прежнему исходить из демонстрации клинической эффективности.

При химиотерапии токсические реакции на лекарства неизбежны, и их необходимо свести к минимуму. Таким образом, частота и тяжесть побочных эффектов, вызванных химиотерапией, и их лечение являются основными проблемами лечения. АНСС действительно смягчает побочные эффекты, связанные с химиотерапией рака. Будет важно определить в клинических испытаниях, позволяют ли достоинства АНСС онкологическим больным переносить терапевтические/высокие дозы цитотоксических препаратов и может ли это соответствовать улучшению качества жизни после химиотерапии. Предполагается, что стратегии добавок с участием АНСС могут значительно повысить экономическую эффективность медицинских вмешательств при лечении рака. Пероральное введение смеси L-цистина и витамина B6 с диетой может быть эффективным химиопрофилактическим средством против вызванной дымом алопеции у мышей [17].

Алопеция (выпадение волос), которая вызвана генотоксичными цитостатическими препаратами, используемыми в химиотерапии, характеризуется

апоптозом и ядерными аберрациями как в экспериментальных [71], так и в клинических условиях [72].

Однако алопеция, вызванная доксорубицином [16] или циклофосфамидом [73,74], демонстрирует дистрофический катагенный паттерн.

Как курительная, так и лекарственная алопеция характеризуются резким усилением апоптоза в дистрофических фолликулах [17].

В нашем исследовании есть параллель с этой точкой зрения, где та самая польза от вызванной лекарствами алопеции (выпадение волос) может быть скорректирована добавками АНСС.

Ясно, что необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить вклад пищевых добавок АНСС в защиту от побочных эффектов химиотерапии. Для новых пищевых добавок реальное доказательство эффективности должно по-прежнему исходить из демонстрации клинической эффективности.

Микроскопический анализ кожи показал сильную потерю волосяных фолликулов в группе лечения Ага-С, но меньшую потерю волосяных фолликулов в группах лечения Ага-С плюс АНСС. Хотя гистологические данные, показывающие развитие выпадения волос в этом исследовании, были недоступны, интересно, что в исследовании алопеции, вызванной курением, D'Agostini et al. [17] выявили, что «гистопатологический анализ нескольких участков тканей кожи с алопецией предполагает полную или частичную атрофию эпидермиса с уменьшением количества клеточных слоев». Волосяные фолликулы в тех же областях были уменьшены в количестве и укорочены. Редкие и мелкие волосяные луковицы всё же обнаруживались в областях алопеции, но митотическая активность была очень скудной или полностью отсутствовала в матрице волосяных фолликулов [17].

Предполагается, что интерлейкин-1 (ИЛ-1) модулирует алопецию. Интересно, что АНСС повышает выработку ИЛ-1, ИЛ-12 и гамма-интерферона, и эти самые механизмы могут способствовать интерлейкин -индуцированной модуляции алопеции.

В дальнейших исследованиях будут изучены уровни ИЛ-1 или ИЛ-2 у крыс, подвергшихся воздействию Ага-С и АНСС + Ага-С, чтобы определить, может ли быть какая-либо корреляция (и) со степенью алопеции у новорожденных и взрослых крыс.

При химиотерапии токсические реакции на лекарства неизбежны, и их необходимо свести к минимуму. Таким образом, частота и тяжесть побочных эффектов, вызванных химиотерапией, и их лечение являются основными проблемами лечения. АНСС действительно смягчает побочные эффекты, связанные с химиотерапией рака. Будет важно определить в клинических испытаниях, позволяют ли достоинства АНСС онкологическим больным переносить терапевтические/высокие дозы цитотоксических препаратов и может ли это соответствовать улучшению качества жизни после химиотерапии.

Предполагается, что стратегии добавок с участием препарата АНСС могут значительно повысить экономическую эффективность медицинских вмешательств при лечении рака. Пероральное введение смеси L-цистина/витамина В6 с диетой станет эффективным химиопрофилактическим средством против вызванной дымом алопеции у мышей [17]. Алопеция, вызванная генотоксичными цитостатическими препаратами, используемыми в химиотерапии рака, характеризуется апоптозом и ядерными абберациями как в экспериментальных [71], так и в клинических условиях [72].

Однако алопеция, вызванная доксорубицином [16] или циклофосфамидом [73,74], демонстрирует дистрофический катагенный паттерн.

Как курительная, так и лекарственная алопеция характеризуются резким усилением апоптоза в дистрофических фолликулах [17]. В нашем исследовании есть параллель с этой точкой зрения, где польза от вызванной лекарствами алопеции (выпадение волос) может быть скорректирована добавками АНСС.

Ясно, что необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить вклад пищевых добавок АНСС в защиту от побочных эффектов химиотерапии. Для новых пищевых добавок реальное доказательство эффективности должно по-прежнему исходить из демонстрации клинической эффективности.

## Конфликт интересов

Не декларировался.

## Использованная литература

[1] Viale PH. Chemotherapy and cutaneous toxicities: implications for oncology nurses. *Semin Oncol Nurs* 2006;22:144–51.

[2] Symonds RP, Foweraker K. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Curr Obstet Gynaecol* 2006;16:100–6.

[3] Tappenden P, Chilcott J, Ward S, Eggington S, Hind D, Hummel S. Methodological issues in the economic analysis of cancer treatments. *Eur J Cancer* 2006;42:2867–75.

[4] Niezen MGH, Stolk EA, Steenhoek A, Uyl-De Groot CA. Inequalities in oncology care: economic consequences of high cost drugs. *Eur J Cancer* 2006;42: 2887–92.

[5] Lista P, Porcu P, Avanzi GC, Pegoraro L. Interleukin-3 enhances the cytotoxic activity of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) on acute myeloblastic leukaemia (AML) cells. *Br J Haematol* 1988;70:121.

[6] Cannistra SA, Groshek P, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the cytotoxic effects of cytosine arabinoside in acute myeloblastic leukemia and in the myeloid blast crisis phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1989;3:328–34.

[7] Jacobs P. Myelodysplasia and the leukemias. *Disease-a-Month* 1997;43: 639–44.

[8] Grant S, Ara-C. cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 1988;72:197–233.

[9] Parisi E, Draznin J, Stoopler E, Schuster SJ, Porter D, Sollecito TP. Acute myelogenous leukemia: advances and limitations of Treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:257–63.

[10] Lengfelder E, Saussele S, Weisser A, Buchner T, Hehlmann R. Treatment concepts of acute promyelocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2005;56: 261–74.

[11] Gilhar A, Landau M, Assy B, Shalaginov R, Serafimovich S, Kalis RS. Melanocyte associated T cell epitopes can function as autoantigens for transfer of alopecia areata to human scalp explants on Prkdc (scid) mice. *J Invest Dermatol* 2001;117:1357–62.

[12] Han A, Mirmirani P. Clinical approach to the patient with alopecia. *Semin Cutan Med Surg* 2006;25:11–23.

[13] Wade MS, Sinclair RD. Disorders of hair in infants and children other than alopecia. *Clinic Dermatol* 2002;20:16–28.

[14] Lutz ME, Pittelkow MR. Progressive generalized alopecia due to systemic amyloidosis. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:434–6.

[15] D'Agostini F, Balansky R, Pesce C, Fiallo P, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Induction of alopecia in mice exposed to cigarette smoke. *Toxicol Lett* 2000;114:117–23.

[16] D'Agostini F, Bagnasco M, Giunciuglio D, Albini A, De Flora S. Inhibition by oral N-acetylcysteine of doxorubicin-induced clastogenicity and alopecia, and prevention of primary tumors and lung micrometastases in mice. *Int J Oncol* 1998;13:217–24.

[17] D'Agostini F, Fiallo P, Pennisi TM, De Flora S. Chemoprevention of smoke-induced alopecia in mice by oral administration of L-cystine and vitamin B6. *J Dermatol Sci* 2007;46:189–98.

[18] Smith GB, Fenske NA. Cutaneous manifestations and consequences of smoking. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:717–32.

[19] Hersh EM, Wong VG, Henderson ES, Freirich EJ. Hepatotoxic effects of methotrexate. *Cancer* 1966;19:600–6.

[20] Dervieux T, Hancock ML, Pui C-H, Rivera GK, Sandlund JT, Boyett J, et al. Antagonism by methotrexate on mercaptopurine disposition in lymphoblasts during up-front treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:506–16.

[21] Kamen BA, Nylén PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cell as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *Br J Haematol* 1981;49:355–60.

[22] Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 1998;339: 605–15.

[23] Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1986;29:832–5.

[24] Kugathasan S, Newman AJ, Dahms BB, Boyle JT. Liver biopsy findings in patients with juvenile rheumatoid arthritis receiving long-term, weekly methotrexate therapy. *J Pediatr* 1996;128:149–51.

[25] Innocenti F, Ratain MJ. Update on pharmacogenetics in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 2002;38:639–44.

[26] McLeod HL, Coulthard S, Thomas AE, Pritchard SC, King DJ, Richards SM, Eden OB, Hall AG, Gibson BE. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;105: 696–700.

[27] Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;93:2817–23.

[28] Cetiner M, Sener G, Sehirlili AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, et al. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;209:39–50.

[29] Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329–39.

[30] Waters TR, Swann PF. Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine. *Biochemistry* 1997;36:2501–6.

- [31] Boerkerink JP, Stet EH, De Abreu RA, Damen FJ, Hulscher TW, Bakker MA, et al. 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1455–63.
- [32] Onderdonk AB, Cisneros RL, Hinkson P, Ostroff G. Anti-infective effect of poly- $\beta$ -1,6-glucotriosyl- $\beta$ -1,3-glucopyranose glucan in vivo. *Infect Immun* 1992;60:1642–7.
- [33] Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans*  $\beta$ -glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T-cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis* 2003;187:710–3.
- [34] Wei D, Williams D, Browder W. Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1163–72.
- [35] Matsui Y, Uhara J, Satoi S, Kaibori M, Yamada H, Kitade H, et al. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol* 2002;37:78–86.
- [36] Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ. The effect of molecular weight and  $\beta$ -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- $\beta$ -D-glucan. *Immunol Cell Biol* 1999;77:395–403.
- [37] Engstad CS, Engstad RE, Olsen JO, Osterud B. The effect of soluble  $\beta$ -1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1585–97.
- [38] Ljungman AG, Leanderson P, Tagesson C. (1-3)- $\beta$ -D-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:273–81.
- [39] Hashimoto T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. Enhanced production of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -glucans in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:131–5.
- [40] Sener G, Eksoglu-Demiralp E, Cetiner M, Ercan F, Yegen BC. Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol* 2006;542:170–8.
- [41] Wakame K. Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in the rat. *Biomed Res* 1999;20:145–52.
- [42] Ghoneim M, Wimbley M, Salem F, Mcklain A, Attallah N, Gill G. Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC). *Int J Immunother* 1995;11:23–8.
- [43] Gao Y, Zhang D, Sun B, Fujii H, Kosuna K-I, Yin Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:1258–66.
- [44] Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obara M, Kobayashi M, Li YQ, et al. Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anti-Cancer Drugs* 1998;9:343–50.
- [45] Cowawintaweevat S, Manoromana S, Sriplung H, Khuhaprema T, Tongtawe P, Tapchaisri P, et al. Prognostic improvement of patients with advanced liver cancer after active hexose correlated compound (AHCC) treatment. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2006;24:33–45.
- [46] Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev* 2000;5:4–27.
- [47] Hirose A, Sato E, Fujii H, Sun B, Nishioka H, Arouma OI. The influence of active hexose correlated compounds (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222:152–8.
- [48] Aviles H, Belay T, Fountain K, Vance M, Sun B, Sonnenfeld G. Active hexose correlated compound enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol* 2003;95:491–6.
- [49] Omura T, Sato R, Coopen DY, Rosenthal OE, Estabrook RW. Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed Proc* 1965;24:1181–9.
- [50] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.
- [51] Dehnen W, Tomingas R, Roos J. A modified method for the assay benzo[a]pyrene hydroxylase. *Anal Biochem* 1973;53:373–83.
- [52] Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolff T, et al. Dealkylation of pentoxifyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by Phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch Biochem Biophys* 1985;238:43–8.
- [53] Rose PG. Chemotherapy for newly diagnosed and relapsed advanced ovarian cancer. *Semin Oncol Nursing* 2003;19(Suppl. 2):25–35.
- [54] Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001–20.
- [55] Morris JA. The kinetics of epithelial cell generation: its relevance to cancer and aging. *J Theor Biol* 1999;199:281–99.
- [56] Britten RA, Evans AJ, Allalunis-Turner MJ. Effect of cisplatin on the clinically relevant radiosensitivity of human cervical carcinoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:367–74.
- [57] Lipsztein R, Kredentser D, Dottino P, Goodman HM, Dalton JF, Bloomer WD, et al. Combined chemotherapy and radiation therapy for advanced carcinoma of the cervix. *Am J Clin Oncol* 1987;10:527–30.
- [58] Su CG, Stein RB, Lewis JD, Lichtenstein GR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inflammatory bowel disease: do risks outweigh benefits? *Digest Liver Dis* 2000;32:518–31.
- [59] Pectasides D, Pectasides E, Economopoulos T. Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer. *Cancer Treat Rev* 2007;33:177–90.
- [60] Imyanitov EN, Moiseyenko VM. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations. *Clin Chim Acta* 2007;79:1–13.
- [61] Camitta B, Mahoney D, Leventhal B, Lauer SJ, Shuster JJ, Adair S, et al. Intensive intravenous methotrexate and mercaptopurine treatment of higher-risk non-T, non-B acute lymphocytic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1994;12:1383–99.
- [62] Mahoney Jr DH, Camitta BM, Leventhal BG, Shuster JJ, Civin CJ, Ganick DJ, et al. Repetitive low dose oral methotrexate and intravenous mercaptopurine treatment for patients with lower risk B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. A Pediatric Oncology Group pilot study. *Cancer* 1995;75:2623–31.
- [63] Mahoney Jr DH, Shuster J, Nitschke R, Lauer SJ, Winick N, Steuber CP, et al. Intermediate-dose intravenous methotrexate with intravenous mercaptopurine is superior to repetitive low-dose oral methotrexate with intravenous mercaptopurine for children with lower-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group phase III trial. *J Clin Oncol* 1998;16:

- [64] Hall PM, Jenner MA, Ahern MJ. Hepatotoxicity in a rat model caused by orally administered methotrexate. *Hepatology* 1991;14:906–10.
- [65] Mack DR, Young R, Kaufman SS, Ramey L, Vanderhoof JA. Methotrexate in patients with Crohn's disease after 6-mercaptopurine. *J Pediatr* 1998;132: 830–5.
- [66] Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75: 274–81.
- [67] Schmiegelow K. Prognostic significance of methotrexate and 6-mercaptopurine dosage during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1991;8:301–12.
- [68] Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2001–8.
- [69] Peeters M, Koren G, Jakubovicz D, Zipursky A. Physician compliance and relapse rates of acute lymphoblastic leukemia in children. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:228–32.
- [70] Mantdakis E, Smith AK, Hynan L, Winik NJ, Kamen BA. Methotrexate polyglutamation may lack prognostic significance in children with B cell precursor acute lymphoblastic leukemia treated with intensive oral methotrexate. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:636–42.
- [71] Cece R, Cazzaniga S, Morelli D, Sfondrini L, Bignotto M, Me'nard S, et al. Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest* 1996;75:601–9.
- [72] Goldberg MT, Tackaberry LE, Hardy MH, Noseworthy JH. Nuclear aberrations in hair follicle cells of patients receiving cyclophosphamide: a possible in vivo assay for human exposure to genotoxic agents. *Arch Toxicol* 1990;64:116–21.
- [73] Paus R, Handjiski B, Eichmuller S, Czarnetzki BM. Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *Am J Pathol* 1994;144:719–34.
- [74] Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 1997;151:1601–17