

## Добавление АНСС увеличивает выживаемость мышей после инфекционного заражения

Barry W Ritz

Активное коррелированное соединение гексозы (АНСС) - это ферментированный грибной экстракт, который способствует поддержке иммунной системы. Этот обзор посвящен результатам исследований *in vivo*, посвященных оценке влияния добавок АНСС на выживаемость и иммунный ответ на различные инфекционные агенты, включая вирус гриппа, вирус птичьего гриппа, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и метициллин-устойчивый стафилококк *aureus*. Добавление АНСС, модулирует иммунитет и увеличивает выживаемость в ответ на острую инфекцию, и требует дальнейшего исследования.

© 2008 International Life Sciences Institute

### Введение

Использование лекарственных грибов для поддержки иммунитета имеет давние традиции в азиатских культурах. В последнее время такие продукты приобрели популярность в США и в других странах, так что оцениваемый мировой рынок в настоящее время составляет более 6 миллиардов долларов<sup>1</sup>. Одним из таких продуктов является активное коррелированное соединение гексозы (АНСС), ферментированный экстракт мицелия *Basidi* - гриб омицеты, который производится компанией Amino Up, Саппоро, Япония, и продается в по всему миру как пищевая добавка. Это соединение содержит смесь полисахаридов, аминокислот, липидов и минералов. Преобладающими компонентами АНСС являются олигосахариды, составляющие около 74% от веса. Из этих олигосахаридов почти 20% представляют собой частично ацетилированные  $\alpha$ -1,4-глюканы со средней молекулярной массой менее 5000 Дальтон (Рисунок 1). Считается, что эти  $\alpha$ -1,4-глюканы являются одним из активных соединений в АНСС. В качестве альтернативы, активность  $\beta$ -глюканов, полученных из грибов и клеточных стенок дрожжей, хорошо изучена и, по-видимому, активирует врожденный иммунитет путем связывания с лектинами С-типа, такими как Dectin - 1, экспрессируемыми на поверхности макрофагов, дендритных клеток, естественных киллеров (NK) и клеток  $g/dT.5$  Неизвестно, имеют ли  $\alpha$ -1,4-глюканы из АНСС влияют на врожденный иммунитет посредством аналогичного механизма.

Исследования добавок с АНСС продемонстрировали положительное влияние на иммунную функцию у грызунов (2,3,6-9) и людей (4,10,11), а также антиоксидантные эффекты (12,13). Эти отчеты также предполагают, что АНСС хорошо переносится грызунами и людьми.

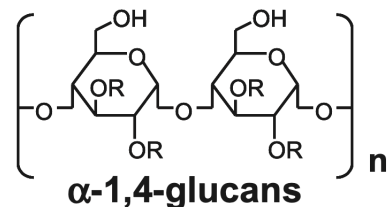
На сегодняшний день исследования показали, что добавка АНСС может повышать врожденный иммунитет, в первую очередь за счет повышения

активности NK-клеток у людей (10) и грызунов (3,9) со злокачественными новообразованиями.

Кроме того, добавка АНСС может увеличивать пролиферацию Т-лимфоцитов (6), а также изменять продукцию цитокинов Т-helper (Th 1) и (Th2) в ответ на неспецифические стимулы (6,11). Сообщенные иммуномодулирующие эффекты добавок АНСС суммированы в таблице 1.

Этот обзор посвящен сообщениям о влиянии добавок АНСС на иммунный ответ на острую инфекцию у мышей. Использование модельного организма, такого как мыши, предлагает единственные этические, практичные и надежные средства оценки иммунного ответа *in vivo* на инфекционные агенты. (19,20) Исследования, проведенные на сегодняшний день, изучают АНСС в качестве потенциальной меры противодействия инфекционному заболеванию у мышей были включены следующие инфекционные агенты: вирус гриппа (H1N1), вирус птичьего гриппа (H5N1), *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) в качестве оппортунистических инфекций.

Результаты этих исследований сведены в Таблицу 2 и подробно обсуждаются ниже.



Partially acetylated, R: H or CH<sub>3</sub>CO-

Рисунок 1

Химическая структура предлагаемого активного соединения в АНСС.

<sup>1</sup> Affiliation: *BW Ritz* is with the Department of Bioscience and Biotechnology, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, USA. Correspondence: *BW Ritz*, Department of Bioscience and Biotechnology, Drexel University, 3141 Chestnut Street, Philadelphia, PA 19104,

## Грипп

Вирусы гриппа представляют собой серьезную угрозу общественному здоровью в Соединенных Штатах и во всем мире и являются основной причиной заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний, особенно среди пожилых людей, маленьких детей и лиц с ослабленным иммунитетом. (22–24) Вирусы гриппа инфицируют эпителиальные клетки дыхательных путей, что приводит к острым респираторным инфекциям, известным под общим названием грипп, и является причиной как сезонных заболеваний, эпидемий, так и случайных пандемий. Вирусы гриппа принадлежат к семейству вирусов *orthomyxoviridae*, которое включает вирусы гриппа А, В и С, а также к роду *Thogotovirus*, клещевым вирусам, которые генетически и структурно сходны с вирусами гриппа. (25)

Вирусы гриппа дополнительно дифференцируются по их поверхностному фенотипу, который состоит из комбинации одной из 16 известных подгрупп гликопротеинов гемагглютинаина (H) и одной из девяти подгрупп нейраминидазы (N) (26). Подтип H1N1 вируса гриппа А отличается от недавно появившегося высоковирулентного вируса птичьего гриппа H5N1.

**Table 1 Summary of reported immunomodulatory effects of AHCC supplementation.**

Reported effects	References
↓ Tumor formation	Matsushita et al. (2005) <sup>3</sup> Sun et al. (2001) <sup>14</sup>
↓ Infection	Aviles et al. (2008) <sup>2</sup> Ritz et al. (2006) <sup>15</sup> Fujii et al. (2007) <sup>16</sup> Aviles et al. (2003) <sup>17</sup> Ishibashi et al. (2000) <sup>18</sup>
↑ NK cell activity	Ghoneum et al. (1995) <sup>10</sup> Uno et al. (2000) <sup>11</sup> Ritz et al. (2006) <sup>15</sup>
↑ T cell proliferation (ConA, LPS)	Aviles et al. (2004) <sup>6</sup>
Altered cytokine production	Aviles et al. (2008) <sup>2</sup> Aviles et al. (2004) <sup>6</sup> Uno et al. (2000) <sup>11</sup>
↑ Nitric oxide release by peritoneal cells	Aviles et al. (2004) <sup>6</sup>

*Abbreviations:* NK, natural killer; ConA, concanavalin A; LPS, lipopolysaccharide.

Чтобы определить потенциальное влияние добавок АНСС на иммунный ответ на вирус гриппа H1N1, молодым (6-8-недельным) самцам мышей C57BL / 6 перорально вводили 1 г / кг массы тела / день АНСС или воду в качестве контроля в течение 7 дней до и в течение всего периода инфекции. 15 Мышей с добавками и контрольных мышей инфицировали интраназально (в) 100 единицами гемагглютинации (HAU) адаптированного к мышам вируса гриппа (Influenza A / Puerto Rico / 8). / 34).

Мыши, которым вводили японский АНСС, показали повышенную выживаемость и сохраняли массу тела во время инфекции по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует о менее тяжелой инфекции. Добавление АНСС также привело к усилению активности NK-клеток в легких, а так же селезенке и быстрому выведению вируса из легких. Наконец, мыши, получавшие добавку АНСС, продемонстрировали улучшенную целостность эпителия ткани легких после инфекции гриппа по сравнению с контрольной группой, а также снижение инфильтрации лимфоцитов и макрофагов в легких. Взятые вместе, эти данные предполагают, что добавление АНСС увеличивало активность NK-клеток в ответ на инфекцию гриппа, что было связано со снижением титров вируса легких, менее тяжелой инфекцией и увеличением выживаемости.

## Птичий грипп

Вирусы гриппа типа А претерпевают постоянные генетические изменения, которые периодически приводят к появлению новых штаммов. Новые штаммы являются результатом либо антигенного дрейфа (накопление точечных мутаций), либо антигенного сдвига (перегруппировки вирусного генома в результате смешения двух или более вирусных подтипов).

Антигенный дрейф отвечает за сезонные колебания в распространенных циркулирующих штаммах вируса гриппа. Эксперты изучают антигенный дрейф, чтобы предсказать, какие вирусы будут циркулировать в течение сезона гриппа, потому что эффективность трехвалентной вакцины против гриппа зависит от точности соответствия между вирусами, которые содержатся в вакцине и вирусами, циркулирующими в обществе. Антигенный сдвиг приводит к более резким изменениям вируса, и примеры включают появление H1N1 в 1918 году (испанский грипп), появление H2N2 в 1957 году (азиатский грипп), появление H3N2 в 1968 году (гонконгский грипп) и повторное появление H1N1 в 1977 г. (Русский грипп) (27). Совсем недавно у домашней птицы появился подтип вируса гриппа А H5N1. Первые случаи заражения человека вирусом H5N1 были зарегистрированы в Гонконге в 1997 году после прямого контакта с инфицированной птицей. Восемнадцать подтвержденных инфекций людей привели к шести смертельным исходам (28). Вспышка H5N1 среди домашних птиц в Азии в конце 2003–2004 гг. унесла жизни около 150 миллионов птиц. С 2003 г. подтвержденных случаев инфицирования людей высоковирулентным вирусом птичьего гриппа H5N1 было 365, а общий уровень смертности превысил 60% (29).

**Table 2** Outcomes from in vivo studies evaluating the effects of AHCC supplementation on survival and immune response following challenge with infectious agents.

Agent (route of infection)	Mice			AHCC supplementation		Outcome	Reference
	Strain	Age	No.	Dose (route of admin.)	Duration		
Influenza - H1N1 (i.n.)	C57BL/6	6-8 wk	20	1 g/kg/d (oral)	7 d + during infection	↑ Survival ↓ Severity (as weight loss)	Ritz et al. (2006) <sup>15</sup>
	C57BL/6	6-8 wk	3	1 g/kg/d (oral)	7 d + during infection	↓ Lung virus titer ↑ NK cell activity	Ritz et al. (2006) <sup>15</sup>
Avian influenza - H5N1 (i.n.)	Balb/c	6-8 wk	40	0.5 g/kg/d (gavage)	7 d	↑ Survival	Fujii et al. (2007) <sup>16</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (i.p.) + stress (hindlimb-unloading)	Swiss/ Webster	9-11 wk	12-16	1 g/kg/d (gavage)	7 d + during infection	↑ Survival	Aviles et al. (2003) <sup>17</sup>
						↓ Susceptibility to infection ↑ Bacterial clearance	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (i.m.)	Swiss/ Webster	9-11 wk	4-8	1 g/kg/d (gavage)	7 d + during infection	↑ Survival ↑ Bacterial clearance Altered cytokine expression	Aviles et al. (2006) <sup>21</sup> Aviles et al. (2008) <sup>2</sup>
<i>Candida albicans</i> (i.v.) + immunosuppressed (cyclophosphamide)	CD-1 (ICR)	4 wk	15-23	1 g/kg/d (oral)	4 d	↑ Survival	Ishibashi et al. (2000) <sup>18</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (i.p.) + immunosuppressed (cyclophosphamide)	CD-1 (ICR)	4 wk	8-9	1 g/kg/d (oral)	4 d	↑ Survival	Ishibashi et al. (2000) <sup>18</sup>
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (i.v.) + immunosuppressed (cyclophosphamide)	CD-1 (ICR)	4 wk	8-9	0.5 g/kg/d (i.p.)	4 d	↑ Survival	Ishibashi et al. (2000) <sup>18</sup>

Abbreviations: No., number of mice per treatment group; i.n., intranasal; i.p., intraperitoneal; i.m., intramuscular; i.v., intravenous; NR, not reported.

Помимо стран, сообщающих об инфекциях среди людей, инфекции домашних птиц имели место в Малайзии, Иране, Индии, Греции, Италии, Австрии, Германии и Франции. (30) Потенциальные эффекты добавок АНСС против инфекции вирусом птичьего гриппа H5N1 были оценены у молодых (6–8-недельного возраста) самок мышей BALB / c. (16) Мыши получали АНСС в дозе 0,5 г / кг веса тела в день или равный объем раствора фосфатного буфера (PBS) через желудочный зонд в течение 7 дней.

Через 21 или 28 дней после обработки мышей инфицировали со 100-кратной 50% летальной дозой вируса птичьего гриппа H5N1. Контрольные мыши, не получавшие АНСС, продемонстрировали 100%-ную смертность в течение 12 дней после заражения. Напротив, те мыши, которым вводили АНСС в течение 7 дней и инфицировали через 21 или 28 дней после лечения, продемонстрировали выживаемость 20% и 30% соответственно.

Эти данные очень интригуют и оправдывают дополнительные исследования использования АНСС в комбинации с практикой вакцинации.

## Клебсиелла пневмонии

Влияние добавок АНСС на устойчивость к инфекции *Klebsiella pneumoniae*, в основном связанного с бактериальной пневмонией, а так же инфекциями мочевыводящих путей, условно-патогенными или внутрибольничными инфекциями, оценивали в двух экспериментальных моделях: разгрузка задних конечностей (17) и хирургическая инфекция (2). (21) Разгрузка задних конечностей, или наклон головы вниз на 15–20 °, является моделью иммуносупрессии, связанной со стрессом, и из-за отсутствия нагрузки на задние конечности и сдвига жидкости в голову используется для приблизительного определения условий микрогравитации - опыты во время космических полетов. Группам мышей Swiss/ Webster добавляли 1 г/ кг массы тела в день контроля носителя АНСС или PBS через желудочный зонд в течение 7 дней перед разгрузкой задних конечностей и в течение всего периода суспендирования и заражения. (17) Мышей приостанавливали на 2 дня

до заражения одной 30% смертельной дозой *K. pneumoniae*.

После инфицирования мыши, получавшие АНСС, продемонстрировали повышенную выживаемость, увеличенное среднее время до смерти, пониженную восприимчивость к инфекции (что определялось увеличением инфекционной дозы, необходимой для 50% летальности), и увеличенный клиренс бактерий из крови среди этих мышей. которые выжили до 10 дней после заражения.

Затем в хирургической модели внутримышечной инфекции самкам мышей Swiss / Webster добавляли 1 г / кг массы тела / день АНСС или контроль PBS через желудочный зонд в течение 7 дней и лишали пищи в течение 24 часов до заражения и через 6 часов после заражения *K. pneumoniae*. (2,21)

Биологическая добавка АНСС индуцировала устойчивость к внутримышечной инфекции 20% летальной дозы *K. pneumoniae*, на что указывало усиление бактериального выведения из крови, легких и печени через 5–6 дней после инфицирования (2). Мыши, получавшие добавку АНСС зараженные 50% летальной дозой *K. pneumoniae* показали более высокую выживаемость по сравнению с контрольной группой (21).

## Опportunистические инфекции

Эффективность АНСС против опportunистических инфекций дополнительно оценивалась в группах мышей с ослабленным иммунитетом, которые были инфицированы летальными дозами *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* или MRSA.18

За четыре дня до инфекции у молодых (4-недельных) индуцировалась лейкопения. ) самок мышей CD-1

(ICR) путем внутрибрюшинного введения препарата циклофосфида 200 мг/кг; затем мышам перорально вводили 1 г/кг массы тела/сут АНСС или вводили контрольный носитель.

Альтернативно АНСС вводили в дозе 0,5 г / кг массы тела внутрибрюшинной инъекцией (группа MRSA). Все три группы мышей, получавших препарат АНСС, показали повышенную выживаемость по сравнению

с контрольной группой. Следовательно, вместе с результатами вышеупомянутых исследований К. рнептопиае, эти данные предполагают, что АНСС увеличивает выживаемость у мышей с ослабленным иммунитетом в ответ на инфекционное заражение.

## Заключение

Изучение биоактивных соединений в качестве потенциальных мер противодействия инфекционным заболеваниям особенно важно, а также в условиях продолжающегося появления новых или все более распространенных инфекционных агентов, включая птичий грипп H5N1 и приобретаемый в сообществе MRSA, соответственно.

Кроме того, изучение агентов, которые изменяют ответ хозяина на острую инфекцию, становится все более привлекательным, учитывая ограничения вакцин и противовирусных стратегий.

Например, неизвестно, будут ли традиционные вакцины эффективны против вируса птичьего гриппа H5N1, и хотя правительства стремятся создать запасы противовирусных препаратов, анализ вирусов гриппа H5N1, выделенных как из образцов домашней птицы, так и из образцов человека, уже продемонстрировал некоторую устойчивость к доступным в настоящее время антивирусным препаратам 31 Важно отметить, что добавка АНСС может показать некоторую пользу в качестве адъюванта вакцины, как в модели инфекции птичьего гриппа на мышах, что требует дальнейшего изучения.

Эти ранние результаты как у иммунокомпетентных, так и у иммуносупрессивных мышей предполагают, что АНСС может увеличивать выживаемость в ответ на широкий спектр инфекционных агентов. Таким образом, крайне важно как продолжить, так и расширить оценку АНСС как потенциального агента для модуляции иммунного ответа на острую инфекцию. В будущих исследованиях необходимо рассмотреть несколько вопросов. Примечательно, что большинство доступных исследований было проведено с использованием дополнительной дозы 1г АНСС на кг массы тела в день или приблизительной эквивалентной дозы 5 г/сут у человека весом 60 кг.

Кроме того, в каждом исследовании АНСС вводили профилактически, поэтому остается неизвестным, повысит ли АНСС выживаемость при введении во время инфекции или после инфицирования. Наконец, необходимы дополнительные исследования для определения механизма действия для общего улучшения иммунного ответа и увеличения выживаемости, наблюдаемых у мышей, которым вводили АНСС, во время острой инфекции по сравнению с контролем. Учитывая множество предварительных положительных результатов при различных инфекциях у мышей, добавка АНСС демонстрирует ценный и клинически значимый потенциал в качестве иммуностимулирующего агента, который заслуживает дальнейшего изучения.

## Используемая литература

1. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich W-D. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005;2:285–299.
2. Aviles H, O'Donnell P, Orshal J, Fujii H, Sun B, Sonnenfeld G. Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. *Am J Surg*. 2008;195:537–545.
3. Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, et al. Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Drugs*. 1998;9:343–350.
4. Matsui Y, Uhara J, Satoi S, et al. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol*. 2002;37:78–86.
5. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans. *J Exp Med*. 2003;197:1119–1124.
6. Aviles H, Belay T, Vance M, Sun B, Sonnenfeld G. Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions. *J Appl Physiol*. 2004;97:1437–1444.
7. Burikhanov RB, Wakame K, Igarashi Y, Wang S, Matsuzaki S. Suppressive effect of active hexose correlated compound (AHCC) on thymic apoptosis induced by dexamethasone in rat. *Endocr Regul*. 2000;34:181–188.
8. Wang S, Wakame K, Igarashi Y, et al. Beneficial effects of active hexose correlated compound (AHCC) on immobilization stress in rat. *Dokkyo J Med Sci*. 2001;28:559–565.
9. Gao Y, Zhang D, Sun B, Fujii H, Kosuna K, Yin Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:1258–1266.
10. Ghoneum M, Wimbley M, Salem F, McKlain A, Attallah N, Gill G. Immunomodulatory and anticancer effects of active hexose correlated compound (AHCC). *Int J Immunother*. 1995;11:23–28.
11. Uno K, Kosuna K, Sun B, et al. Active hexose correlated compound (AHCC) improves immunological parameters and performance status of patients with solid tumors. *Biotherapy (Japan)*. 2000;14:303–309.
12. Ye SF, Ichimura K, Wakame K, Ohe M. Suppressive effects of active hexose correlated compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress. *Life Sci*. 2003;74:593–602.
13. Wang S, Ichimura K, Wakame K. Preventive effects of active hexose correlated compound (AHCC) on oxidative stress induced by ferric nitrilotriacetate in the rat. *Dokkyo J Med Sci*. 2001;28:745–752.



14. Sun B, Mukoda T, Miura T, et al. Anti-tumor effects of genes- tein combined polysaccharide (GCP) and active hexose correlated compound (AHCC). *Biotherapy (Japan)*. 2001;15: 379–382.
15. Ritz BW, Nogusa S, Ackerman EA, Gardner EM. Supplementa- tion with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection. *J Nutr*. 2006;136:2868–2873.
16. Fujii H, Nishioka H, Wakame K, Sun B. Nutritional food active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance against bird flu. *Jap J Complemen Altern Med*. 2007;1:37–39.
17. 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;95:491–496.
18. Ishibashi H, Ikeda T, Tansho S, et al. Prophylactic efficacy of basidiomycetes preparation AHCC against lethal opportunis- tic infections in mice. *J Pharmacol (Japan)*. 2000;120:715–719.
19. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172:2731–2738.
20. Burleson GR, Burleson FG. Influenza virus host resistance model. *Methods*. 2007;41:31–37.
21. Aviles H, O'Donnell P, Sun B, Sonnenfeld G. Active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance to infec- tion in a mouse model of surgical wound infection. *Surg Infect*. 2006;7:527–535.
22. Update: influenza activity—United States, 2004–05 season. *MMWR* 2004;54:328. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza- associated hospitalizations in the United States. *JAMA*. 2003;292:1333–1340.
23. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality asso- ciated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003;289:179–186.
24. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality asso- ciated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003;289:179–186.
25. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
26. Briedis DJ. Orthomyxoviruses. In: Acheson NH, ed. *Fundamen- tals of Molecular Virology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
27. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
28. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al, for the Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *New Engl J Med*. 2005;353:1374–1385.
29. Normile D. Flu virus research yields results but no magic bullet for pandemic. *Science*. 2008;29:1178–1179.
30. World Health Organization. *Avian Influenza*. Available at: [www.who.int/topics/avian\\_influenza](http://www.who.int/topics/avian_influenza). Accessed June 2007.
31. Centers for Disease Control and Prevention. *Avian Influenza (Bird Flu)*. Available at: [www.cdc.gov/flu/avian](http://www.cdc.gov/flu/avian). Accessed January 2008.
32. Guidance for industry: Estimating the maximum safe start- ing dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005. Available at: [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm). Accessed July 2008.