

Взаимодополняющие фунгистатические влияния лактоферрина в сочетании с фунгицидными препаратами на клинические изоляты *Candida*

М. Е. KUIPERS,^{1*} Н. G. DE VRIES,² М. С. EIKELBOOM,¹ D. K. F. MEIJER,¹ и P. J. SWART^{1†}

Подразделение фармакокинетики и доставки лекарств, Институт исследований лекарственных препаратов Университета Гронингена, Университетский центр фармации, 9713 А.В. Гронинген, (1) и отдел медицинской микробиологии, Университетская больница Гронинген, 9713 GZ Гронинген, (2) Нидерланды Поступило в редакцию 9 ноября 1998 г. / Возвращено к доработке 7 января 1999 года / принято 3 августа 1999 года

Из-за растущего числа безуспешных случаев лечения орофарингеального кандидоза у пациентов с тяжелой иммунодепрессией (в основном у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека [ВИЧ]), существует потребность в разработке новых, более эффективных агентов и / или соединений, поддерживающих активность общих противогрибковых средств. Поскольку лактоферрин является одним из неспецифических факторов иммунной защиты, присутствующих в слюне и проявляющих противогрибковую активность, мы изучали противогрибковые свойства человеческого, бычьего и железо обедненной формы лактоферрина в сочетании с флуконазолом, амфотерицином В и 5-фторцитозином *in vitro* против клинических изолятов видов *Candida*. Отличительные противогрибковые активности лактоферрина наблюдались в отношении клинических изолятов *Candida*. МІС, как правило, были определены в диапазоне от 0,5 до 100 мг. мл⁻¹. Интересно отметить, что в комбинационных экспериментах мы наблюдали выраженную совместную активность против роста *Candida* с использованием лактоферрина и трех противогрибковых препаратов. Только в ограниченном диапазоне концентраций обнаружен незначительный антагонизм. Использование лактоферрина и флуконазола оказалось наиболее успешной комбинацией. Значительное снижение минимальных эффективных концентраций флуконазола было обнаружено при его сочетании с относительно низкой концентрацией лактоферрина (1 мг / мл). Такие комбинации по-прежнему приводили к полному ингибированию роста, тогда как наблюдалось до 50% синергетическое действие против нескольких видов *Candida*. Можно сделать вывод, что комбинированное использование лактоферрина и противогрибковых средств против острого кандидоза является привлекательным терапевтическим вариантом. Поскольку нередко сообщалось о флуконазол-устойчивых видах *Candida*,

особенно у ВИЧ-инфицированных пациентов, добавление лактоферрина к существующей терапии флуконазолом может отложить появление резистентности видов против флуконазола. Были начаты клинические исследования для дальнейшего выяснения потенциальной полезности этой комбинированной терапии.

С момента открытия в 1839 году Langenbeck (16) было показано, что род *Candida* является возбудителем многих инфекций во все большем диапазоне анатомических объектов и клинических условий. У нормальных здоровых индивидуумов дрожжи *Candida* классифицируются как комменсальный организм, который может колонизировать как внутренние, так и внешние поверхности. В этих условиях равновесие между хозяином и микрофлорой дрожжей обеспечивает авирулентный, комменсальный статус этого микроорганизма. Это равновесие достигается не только специфическими иммунными ответами, но и неспецифическими факторами, которые секретируются в слюне или слизистых, таких как иммуноглобулин А, лизоцим, лактоферрин и гистатин (25, 27, 31). Ряд предрасположенностей, из которых наиболее распространенным является состояние иммунодефицита пациента, может влиять на баланс. Например, появление кандидоза у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), обоснованно связано с проявлением болезней, связанных со СПИДом и вызванными им болезнями. Фактически, он представляет собой один из факторов, который используется Центрами по контролю и профилактике заболеваний для определения СПИДа (7). Хотя *Candida albicans* замешана в ранних стадиях развития СПИДа, инфекции, вызванные *C. glabrata* и *C. krusei*, становятся все более распространенными на позднем этапе развития СПИДа (13).

До появления эпидемии ВИЧ оральные микотические инфекции обрабатывались полиеновыми противогрибковыми препаратами, такими как амфотерицин В или нистатин, и с азолами, такими как клотримазол или миконазол. Высокий уровень рецидива у ВИЧ-инфицированных пациентов и сообщения о токсических побочных эффектах амфотерицина В привели к использованию азолов в качестве первой линии лечения (10, 17). Поскольку кетоконазол и итраконазол не так легко усваиваются, их использование было ограничено. Хотя флуконазол стал агентом выбора в антимикотической терапии, его широкое применение привело к увеличению резистентности *Candida* к его противогрибковой эффективности (1, 30). Кроме того, использование 5-фторцитозина, как антимикотика, привело к тому, что устойчивые штаммы *Candida* также стали клинически значимыми (14). Из-за растущей частоты неудач при лечении микозов у пациентов с тяжелой иммунодепрессией существует потребность в разработке новых терапевтических средств, которые поддерживают противогрибковую активность антимикотиков(41).

Как уже упоминалось, слюна содержит несколько неспецифических факторов защиты. Среди них лактоферрин, железосвязывающий гликопротеин, присутствующий при относительно высоких концентрациях (до 12 мг / мл) во многих экзокринных жидкостях (33). Белок обладает антимикробными свойствами широкого спектра действия против бактерий, дрожжей и вирусов и играет важную роль в иммунной защите от инфекций слизистых, а так же в молозиве и молоке (4, 6, 12, 15, 33, 37, 38).

Антикандидозная активность лактоферрина, впервые описанная Kirkpatrick и др. (15), обычно объясняется его способностью связывать и секвестрировать железо из окружающей среды (6, 33). Тем не менее, железонасыщенная форма лактоферрина (аполактоферрина) способна убивать как *C. albicans*, так и *C. krusei*, механизмами, связанными с изменениями проницаемости поверхности клеток (24, 37). Кроме того, было установлено, что лактоферрицин В, пептид, полученный ферментативным расщеплением бычьего лактоферрина, оказывает летальное действие на виды *Candida* посредством прямого взаимодействия с поверхностью клетки (3).

Необходимость снижения устойчивости к микроорганизму привела к экспериментам, в которых оценивались совместные эффекты лактоферрина и используемых в настоящее время методы лечения. Это привело к повышенной резистентности к апо лактоферрин-опосредованной гибели клеток, когда были испытаны физиологические концентрации аполактоферрина и sub-MIC (концентрации, вызывающие существенное, но неполное ингибирование роста) фунгицидных препаратов или агентов (23). Однако другие показали, что сочетание лактоферрина и нескольких противогрибковых препаратов привело к уменьшению концентрации лактоферрина, необходимого для ингибирования роста *Candida*, тогда как комбинация лактоферрина и клотриазола даже приводила к синергетической активности против *Candida* (41). В настоящем изучении мы исследовали *in vitro* противогрибковый эффект лактоферрина в сочетании с некоторыми распространенными фунгицидными агентами против нескольких клинических изолятов *Candida*. Потенциал совместного или синергетического действия лактоферрина и противогрибковых препаратов против *Candida* позволила бы снизить дозу стандартных антимикотиков в антимикотической терапии, и в то же время уменьшить индукцию видов, резистентных к лекарственным средствам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы. Три штамма *C. albicans*, четыре штамма *C. glabrata* и один штамм *C. tropicalis*, изолированные из ротовой полости и варьирующиеся по своей восприимчивости в отношении фунгицидных агентов амфотерицина В, флуконазола и 5-флуорцитосина, были получены в стандартной микробиологической лаборатории University Hospital Groningen, Гронинген, Голландия. *C. albicans* ATCC 10231 использовали в качестве контроля во всех

тестах на чувствительность. Все штаммы хранились на сабуродекстрозном агаре(SDA) (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, United Kingdom) при 4 ° С.

Аналитические носители. Для экспериментов мы использовали жидкую среду Сабуро (SLM) (pH 5.6) (Oxoid, Unipath Ltd.) и среду RPMI 1640 (с L-глутамином, без NaHCO₃ и дополненную 2% глюкозой, pH 7,0) (Gibco BRL, Paisley, Шотландия). Эти среды были подготовлены в соответствии с инструкциями производителя. RPMI 1640 использовали, когда изучалась противогрибковая активность 5-фторцитозина. Все остальные соединения анализировали в SLM.

Фунгицидные агенты. Бычий лактоферрин и человеческий лактоферрин (как из Numico Research B.V., Wageningen, Netherlands) растворяли в аналитической среде при соответствующих концентрациях. Железо-лактоферрин (апо-лактоферрин) получали из бычьего лактоферрина путем ночного диализа против 0,1 М лимонной кислоты способом, ранее описанным Массоном и др. (19) и растворяли в аналитической среде при соответствующих концентрациях. Флуконазол (Diflucan I.V, Pfizer B.V., Capelle aan den Yssel, Нидерланды) и 5-фторцитозин (Ancotil; Roche Nederland B.V., Mijdrecht, Нидерланды) растворяли в аналитической среде при соответствующих концентрациях. Амфотерицин В (Fungizone, Bristol-Myers Squibb Company, Woerden, Нидерланды) был приготовлен в концентрации 5 мг / мл в стерильной воде и дополнительно разведен в аналитической среде. Все суспензии готовились в стерильных стеклянных тубах перед добавлением в планшет для микротитрования.

Чтобы исключить фунгицидную активность эндотоксинов, присутствующих в препаратах лактоферрина, антикандидозный эффект липополисахарида (LPS) (Biowhittaker, Inc. Walkerville, Md.) так же был протестирован в диапазоне от 1 до 1000 пг / мл в нашей аналитической системе.

Инокулят. Изоляты дрожжей выращивали на SDA в течение 24 ч при температуре воздуха 35 ° С . Суспензии делали путем выделения пяти колоний из этих культур. Их суспендировали в 10 мл SLM и перемешивали при инкубации в течение 18 ч при 35 ° С на воздухе. Из этой культуры разведение 1:10 в SLM инкубировали в течение 5 ч, что приводило к культивированию в фазе роста. Это перемешивали вихревым смесителем, и мутность была с поправкой на плотность стандарта мутности сульфата бария 0,5 McFarland на 530 нм, что привело к концентрации от 1×10^6 до 5×10^6 клеток на мл, как было описано ранее (29). Исходя из этого, тестовый инокулят был приготовлен в концентрации от 1×10^4 до 5×10^4 клеток на мл путем разбавления 1: 100 в SLM . Подтверждение размера посевного материала было выполнено с использованием модели C Spiral Plater (Spiral Systems, Inc., Цинциннати, Огайо). Сто микролитров автоматически высевали на SDA и инкубировали в течение 18 ч при температуре воздуха 35 ° С , и концентрацию рассчитывали в соответствии со спецификациями производителя.

Формат анализа. В каждую лунку стерильного 96-луночного пластикового

лотка с плоским дном и соответствующими крышками (Corning Costar, Cambridge, United Kingdom) добавили 50 мкл тестового инокулята. Соответствующие концентрации фунгицидных агентов, подлежащих тестированию, добавляли в лунки (от 75 до 150 мкл). Контроли были включены для определения характеристик роста каждого вида *Candida* без наличия противогрибкового агента. Конечный объем на лунку доводили до 200 мкл с использованием используемой среды для анализа (SLM или RPMI).

Инкубация, кривые роста и критерии конечной точки. После инокуляции планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре воздуха 35 °С без перемешивания. Измерения мутности проводились в 0 ч, почасово от 18 до 24 ч и 48 ч при 630 нм в автоматическом считывателе микропланшетов (EIX800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vt.) после ресуспендирования содержимого многоканальной пипеткой. Пузырьки удаляли кончиком стерильной иглы. В лунки, не получавшие визуального или спектрофотометрически измеряемого увеличения мутности через 48 часов, отсутствие роста подтверждали путем инокуляции 20 мкл содержимого лунки на SDA и затем инкубации в течение 5 дней при температуре воздуха 35 °С.

МИС (минимальную ингибирующую концентрацию) определили как самую низкую концентрацию противогрибкового агента, которая существенно ингибировала рост *Candida* через 24 часа в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS) в используемых фунгицидных агентах (22). Все эксперименты проводились четырежды.

Синергетические опыты. Комбинированные эффекты бычьего лактоферрина и флуконазола, амфотерицина В или 5-фторцитозина против роста видов *Candida* были исследованы в тех же экспериментальных условиях, которые использовались для определения МИС. Была подготовлена матрица разведения (восемь на восемь) с восьмикратными разведениями лекарственного средства, которые также включали лекарственные средства, используемые индивидуально. Результаты измерений мутности на длине волны 630 нм были использованы для расчета ингибирующих эффектов комбинаций лекарств на рост *Candida*. Максимальный рост *Candida* был установлен на 0%, а полное ингибирование роста *Candida* было установлено на уровне 100%. Полученные результаты представлены в виде кривых ингибирования роста. Кроме того, для характеристики лекарственно-лекарственных взаимодействий применяли трехмерный аналитический метод в соответствии с методом, описанным Prichard и Shipman(32). Эта экспериментальная конструкция использовалась для идентификации областей, в которых происходили значительные взаимодействия с лекарственными средствами. Вкратце, теоретические аддитивные взаимодействия рассчитывались по кривой доза- эффект отдельных препаратов. Теоретические расчетные аддитивные взаимодействия, изображающие спрогнозированные аддитивные

взаимодействия, затем были вычтены из экспериментальных взаимодействий, полученных с помощью эффектов комбинации лекарств при измерениях мутности при 630 нм, с целью выявления соотношения доза-эффект в более чем ожидаемых взаимодействиях (синергии). Полученная площадь будет казаться горизонтальной плоскостью при 0% ингибирования выше рассчитанной аддитивной площади, если взаимодействия являлись лишь аддитивными. Любые максимальные уровни над этой плоскостью будут свидетельствовать о синергии. Точно так же, любые снижения ниже этой плоскости будут указывать на антагонизм. Например, комбинация 0,5 мг лактоферрина на мл и 100 мкг флуконазола на мл, что приводит к высшей точке до 50%, указывает на то, что указанная комбинация лекарств в указанном диапазоне концентраций вызовет 50% синергический противогрибковый эффект. Другими словами, рост изолята *Candida* ингибируется более эффективно (а именно на 50% более эффективно) с указанной комбинацией лекарств. Аналогично, высшая точка в 25% указывает на антагонистический противогрибковый эффект указанной комбинации лекарств, а это означает, что рост изолята *Candida* ингибируется меньше, чем ожидалось, исходя из отдельных кривых зависимости "доза-эффект" (а именно, на 25% менее эффективно).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибирование роста *Candida*. Активность различных форм лактоферрина (бычьего и человеческого лактоферрина и бычьего аполактоферрина) против нескольких клинических изолятов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. tropicalis* была поределена и сравнивалась с восприимчивостями видов *Candida* к используемым в настоящее время антимикотикам. В соответствии с рекомендациями NCCLS (22) MIC определяли через 24 часа инкубации видов *Candida* с фунгицидными агентами (представлены в таблице 1).

Таблица 1. MIC нескольких фунгицидных агентов против видов *Candida*

TABLE 1. MICs of several antifungal agents against *Candida* species

Isolate ^b	Species	MIC ^a (mean ± SD)				
		Lactoferrin (bovine) (mg/ml)	Apo-lactoferrin (mg/ml)	Amphotericin B (µg/ml)	Fluconazole (µg/ml)	5-Fluorocytosine (µg/ml)
10231	<i>C. albicans</i>	97 ± 46	22 ± 13	0.06 ± 0.05	— ^d	—
Y098	<i>C. albicans</i>	21 ± 1	54 ± 2	0.08 ± 0.03	—	—
Y106	<i>C. albicans</i>	0.5	33 ± 7	0.08 ± 0.03	10	—
Y127	<i>C. albicans</i>	98 ± 42	41 ± 11	0.2 ± 0.07	10	—
Y110	<i>C. glabrata</i>	31 ± 14	57 ± 7	0.2 ± 0.06	156 ± 50	—
Y111	<i>C. glabrata</i>	6 ± 5	<5	0.1 ± 0.07	24 ± 7	—
Y112	<i>C. glabrata</i>	21 ± 8	41 ± 14	0.4 ± 0.05	—	—
Y110 ^e	<i>C. glabrata</i>	—	—	—	—	0.03 ± 0.01
Y140 ^f	<i>C. tropicalis</i>	—	—	—	—	35 ± 5

a -MIC определяли как самую низкую концентрацию фунгицидного агента, которое существенно ингибировало рост *Candida* через 24 часа, в соответствии с рекомендациями NCCLS для тестируемых фунгицидных агентов (22). Все эксперименты проводились четырежды.

b- Изолят 10231 является штаммом ATCC; все остальные изоляты являются клиническими, в основном оральными, изолятами *Candida*.

c -Изолят был испытан в среде RPMI вместо SLM.

d - не определено.

Поскольку противогрибковая активность человеческого лактоферрина была сопоставима к бычьему варианту, или даже в меньшей степени, (результаты не отражены), мы продолжили другие эксперименты с бычьим лактоферрином из-за его лучшей доступности. Бычий лактоферрин и бычий апо-лактоферрин проявляют эквивалентную противогрибковую активность. MIC, найденные для этих двух вариантов, находились на одном уровне, а виды *Candida*, тестируемые в среде SLM, находились в диапазоне от 0,5 до 100 мг / мл (таблица 1).

Фунгицидная активность других используемых в настоящее время антимикотиков в нашей тестовой системе были сопоставимы с теми, которые были получены ранее из микробиологических служб университетской больницы, что подтверждает точность нашей тестовой системы (результаты не отражены).

Поскольку лактоферрин способен связывать LPS (8), мы хотели исключить вклад LPS в фунгицидную активность этих молочных белков. Мы отметили, что при повышении концентрации LPS до 1000 пг на 1 мл уничтожение видов *Candida* не происходило.

Совместная или синергетическая деятельность. Из группы клинических изолятов мы выбрали четыре вида *Candida*, в зависимости от их восприимчивости к тестируемым противогрибковым препаратам, для изучения комбинированной активности лактоферрина и флуконазола, амфотерицина В и 5-фторцитозина. Для этого мы использовали матрицу разведения с 8-кратным разведением лекарств, измерив влияние на рост *Candida*. Результаты представлены как расчеты влияния обоих соединений на ингибирование видов *Candida*, а также представлены в виде так называемых синергетических диаграмм, в которых фактические экспериментальные значения "доза-эффект" сравнивались с теоретическими значениями "доза-эффект" (см. Материалы и методы). Для аддитивного взаимодействия двух противогрибковых препаратов фактические экспериментальные кривые "доза-эффект" должны совпадать с теоретическими (без исключения ингибирования роста *Candida*), но любые пики выше или ниже этих значений (выше или ниже исходного уровня [0%]) будут свидетельствовать о синергетических или нежелательных антагонистических взаимодействиях, соответственно.

Сочетание флуконазола и лактоферрина. Совокупный эффект флуконазола и лактоферрина на рост изолята *Candida* Y110 показан на рисунке 1. Было обнаружено, что данный штамм *Candida* полностью ингибируется в своем

росте при использовании 50 мкг флуконазола на мл в сочетании с 10 мг лактоферрина на мл, тогда как их МІС против этого изолята составляли 156 мкг / мл и 31 мг / мл соответственно (таблица 1). Следовательно, полное торможение роста возможно при более низких концентрациях антимикотика, чем может быть экстраполировано из МІС . Это так же относится и к другим комбинациям лактоферрина и флуконазола (рис.1). Несколько комбинаций флуконазола и лактоферрина приводили к явному синергетическому антикандидозному эффекту против Y110, как показано на рисунке 2. Эффекты наблюдались выше исходного уровня от 5 до 50% . Например, комбинация 0,5 мг лактоферрина на мл и 100 мкг флуконазола на мл приводила к 50% синергетическим эффектам, в то время как 25 мг лактоферрина на мл в комбинации с 3,3 мкг флуконазол на мл индуцировал только дополнительный 5% антикандидозный эффект. В диапазоне МІС обоих соединений синергетические эффекты не были очевидны. Это ожидалось, потому что концентрации флуконазола в диапазоне его МІС должны быть сами по себе способными полностью ингибировать рост *Candida*. Важно отметить, что для этого изолята антагонистической антикандидозной активности между лактоферрином и флуконазолом не наблюдалось .

Y127, не содержащий лактоферрин изолят *Candida* (МІС 98 мг / мл) полностью ингибировался с использованием 10 мг лактоферрина на мл в комбинации с 1 мкг флуконазола на мл, тогда как МІС флуконазола составлял 10 мкг / мл (рис.3).

Рис.1 Флуконазол (ug/ml) Лактоферрин (mg/ml)
(ug/ml) Лактоферрин (mg/ml)

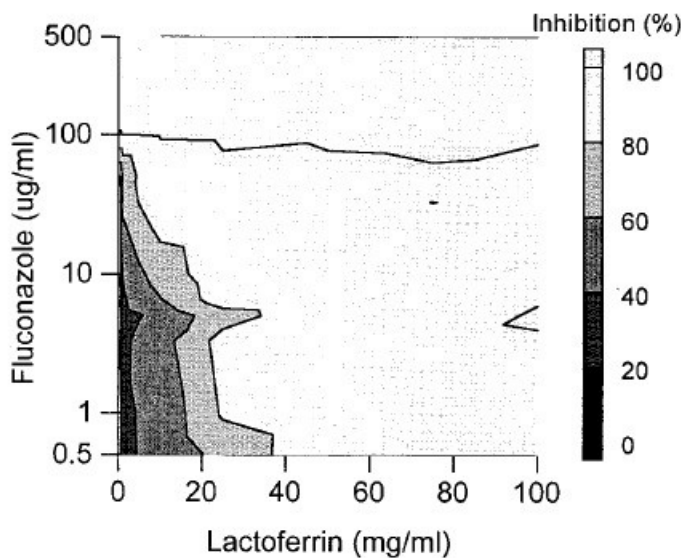


Рис.2 Флуконазол

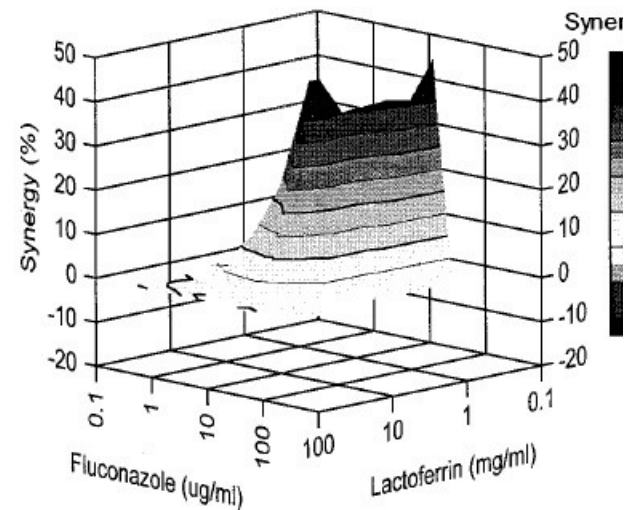


Рис.1 Комбинированное ингибирующее действие лактоферрина и флуконазола на рост изолята *C. glabrata* Y110. График демонстрирует синергизм (то есть потенцирование ингибирования выше ожидаемой аддитивности), наблюдаемое в сочетании двух соединений). Количество ингибирования роста *Candida* указано полосой справа.

Рис. 2. Комбинированные ингибирующие эффекты лактоферрина и флуконазола на рост изолята *C. glabrata* Y110. График демонстрирует синергизм (то есть потенцирование ингибирования выше ожидаемой аддитивности), наблюдаемое в сочетании двух соединений). Показано на переднем плане графика синергии. Показатель синергии продемонстрирован полосой справа.

Рис.3 Флуконазол (ug/ml) Лактоферрин (mg/ml)
Лактоферрин (mg/ml)

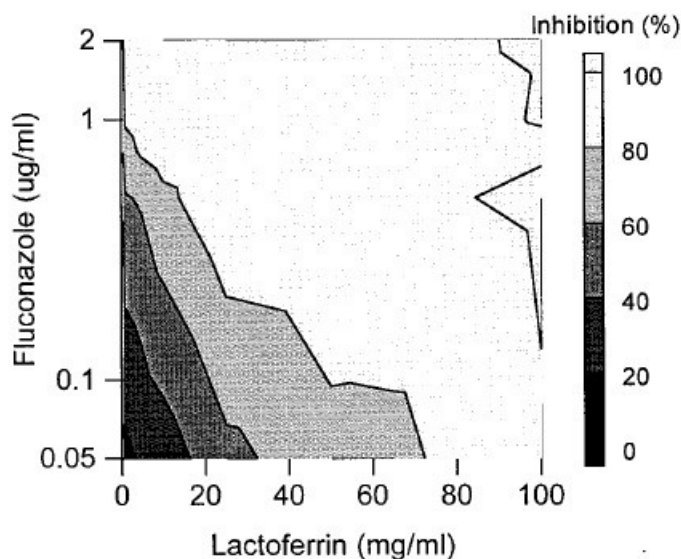


Рис.5 Флуконазол (ug/ml)

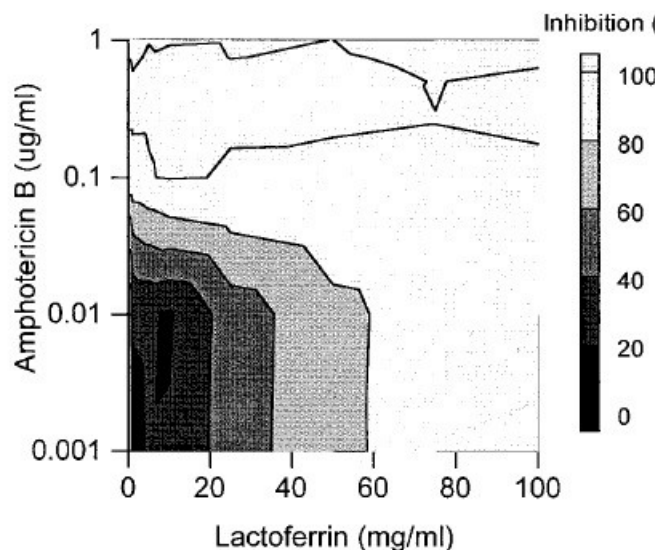


Рис.3 Комбинированное ингибирующее действие лактоферрина и флуконазола на рост *C. albicans* выделяют Y127. Показано верхней отметкой трехмерной графы "доза-эффект"(см. комментарий к рис.1). Количество ингибирования роста *Candida* указано полосой справа.

Рис.5 Комбинированные ингибирующие эффекты лактоферрина и амфотерицина В на рост изолята *C. glabrata* Y110. Показано верхней отметкой трехмерной графы "доза-эффект"(см. комментарий к рис.1). Количество ингибирования роста *Candida* указано полосой справа.

Рис.4 Флуконазол (ug/ml) Лактоферрин (mg/ml)

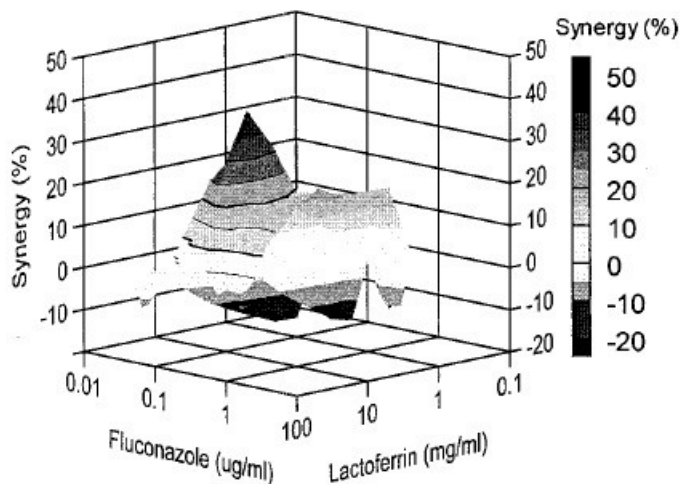


Рис.4 Комбинированное ингибирующее действие лактоферрина и флуконазола на рост *C. albicans* выделяют Y127. График демонстрирует синергизм (то есть потенцирование ингибирования выше ожидаемой аддитивности), наблюдаемое при сочетании двух соединений. Показано на переднем плане графика синергии. Показатель синергии продемонстрирован полосой справа.

Для этого вида были обнаружены антагонистические эффекты наряду с синергическими эффектами на ингибирование роста *Candida* в диапазоне от 20 до 40% (20% антагонизм до 40% синергизма). Например, комбинация 1 мг лактоферрина на мл и 0,05 мкг флуконазола на мл приводила к примерно 20% антагонистическим эффектам; другими словами, было обнаружено на 20% меньше ингибирование роста *Candida*, чем теоретически можно было ожидать на основе индивидуальных ингибирующих эффектов лактоферрина и флуконазола. Напротив, 25 мг лактоферрина на мл в сочетании с 0,5 мкг флуконазола на 1 мл индуцировали до 40% ингибирования дополнительного роста (рис.4).

Аналогично, Y111, один из более чувствительных к лактоферрину штаммов, эффективно ингибировался комбинациями лактоферрина и флуконазола. Сокращение более 50% ВП обоих соединений против этого изолята (1 мг лактоферрина на мл с 10 мкг флуконазола на мл) привело к полному ингибированию роста *Candida*. Совместная деятельность флуконазола и лактоферрина продемонстрировала несколько лучшие результаты антагонистической активности (10%) с незначительными количествами обоих соединений (0,005 мг лактоферрина на мл и 0,3 мкг флуконазола на мл), но были явно синергическими (50%) с концентрациями 0,5 мг лактоферрина на мл и 10 мкг флуконазола на мл.

Сочетание амфотерицина В и лактоферрина. Так же эффективное ингибирование роста *Candida* наблюдалось в комбинации амфотерицина В и лактоферрина против изолята Y110. Полное ингибирование роста *Candida* наблюдалось при 0,5 мг лактоферрина на мл и 0,1 мкг амфотерицина В на мл

(рис.5). Кроме того, были продемонстрированы как умеренное антагонистическое (10%), так и синергетическое (30%) ингибирование роста *Candida* в определенных концентрациях (рис.6).

Рис.6 Амфотерицин В- Лактоферрин

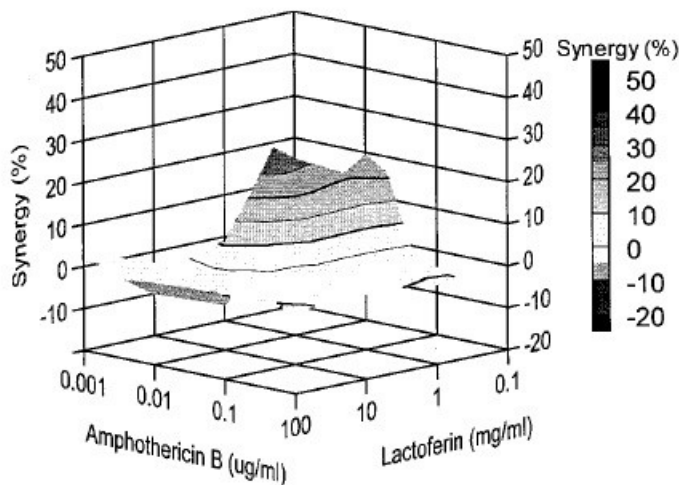


Рис.6 Комбинированные ингибирующие эффекты лактоферрина и амфотерицина В на рост изолята *S. glabrata* Y110. График демонстрирует синергизм (то есть потенцирование ингибирования выше ожидаемой аддитивности), наблюдаемое при сочетании двух соединений. Показано на переднем плане графика синергии. Показатель синергии продемонстрирован полосой справа.

В случае изолята Y127, комбинация лактоферрина и амфотерицина В не приводила к резкому уменьшению требуемых концентраций лактоферрина или амфотерицина В для получения полного ингибирования *Candida*. Полное ингибирование роста *Candida* можно было получить только при концентрациях амфотерицина В или лактоферрина, близко к их МИС. Тем не менее наблюдались незначительные антагонистические (10%), а также синергетические (30%) эффекты этой комбинации против Y127. Эффект 30% синергизма был обнаружен с 30 мг лактоферрина на мл в сочетании с 0,1 мкг амфотерицина В на мл, что является лишь небольшим уменьшением от МИС самого амфотерицина В (0,15 мкг / мл).

Комбинация 5-фторцитозина и лактоферрина. Комбинация 5-фторцитозина и лактоферрина приводила к эффективному ингибированию роста изолята Y110. Наблюдалось 100% ингибирование роста с 0,0008 мкг 5-фторцитозина на мл (уменьшение в 30 раз по сравнению с установленным МИС) в комбинации с 0,02 мг лактоферрина на мл. Эта комбинация противогрибковых препаратов продемонстрировала четкую синергетическую активность против Y110 50% с 0,025 мкг 5-фторцитозина на мл в сочетании с 0,01 мг лактоферрина на мл. Тем не менее, незначительные антагонистические эффекты 5% на ингибирование роста наблюдались также с 0,001 мкг 5-фторцитозина на мл в сочетании с 0,01 мг

лактоферрина на мл.

Изолят *C. С. tropicalis* Y140 является устойчивым к 5-фторцитозину изоляту (см. Также таблицу 1). Мы исследовали фунгицидный эффект против Y140 только комбинацией 5-фторцитозина и лактоферрина. К сожалению, полное ингибирование роста *Candida* не наблюдалось; достигнуто только 90% ингибирование. Кроме того, наблюдались лишь умеренные синергетические эффекты 15% с 10 мг лактоферрина на мл и 10 мкг 5-фторцитозина на мл и антагонистические эффекты 10% с 0,001 мг лактоферрина на мл и 45 мкг 5-фторцитозина на мл .

ОБСУЖДЕНИЕ

C. albicans и другие виды *Candida* являются распространенными патогенами, которые часто вызывают пероральные инфекции у иммунокомпетентных лиц с ослабленным иммунитетом, вследствие подавления местных, а также системных, защитных механизмов (34). Из-за увеличения заболеваемости грибковыми инфекциями был введен набор фунгицидных агентов широкого спектра действия. Например, ВИЧ-инфицированные пациенты, которые подвергаются нескольким эпизодам орального кандидоза, существенно лечились флуконазолом, одним из доступных триазолов. Тем не менее, устойчивые к флуконазолу виды *Candida* наблюдались даже у пациентов, у которых не было истории лечения азолом. У таких пациентов был довольно сильно ослаблен иммунитет (низкий уровень CD4 или C2 или -3 категории ВИЧ-инфекции) (39). Привлекательным терапевтическим вариантом в таких случаях может стать сочетание активных агентов с различными способами действия.

Более ранние исследования уже показали, что собственные компоненты защиты иммунной системы способны убивать несколько видов *Candida*, такие как *histatins* и отдельные белки слюны, - лизоцим и лактоферрин. Таким образом, данные продукты представляют собой располагающий выбор, и которые можно использовать в сочетании с распространенными фунгицидными препаратами, поскольку доступность и токсичность эндогенных средств никаким образом не вызывает опасений.

Мы сосредоточили наше внимание на лактоферрине, поскольку было продемонстрировано, что этот молочный белок не только способен ингибировать рост нескольких бактерий и видов *Candida*, но также имеет важную активность против нескольких вирусов (ВИЧ, вирус простого герпеса и цитомегаловирус человека) (12 , 18, 38).

До проведения комбинированных экспериментов мы проверяли фунгицидное действие различных лактоферринов и некоторых распространенных противогрибковых препаратов. Мы обнаружили, что лактоферрин способен ингибировать рост нескольких видов *Candida* и что MIC этого молочного белка

обычно варьируются от 0,5 до 100 мг / мл. Потенциальные механизмы, с помощью которых лактоферрин ингибирует рост дрожжей, обсуждались ранее Nikawa и др. (24) В качестве возможных объяснений фунгицидной активности лактоферрина были упомянуты структурные изменения в стенке микробной клетки, косвенные эффекты на активацию фермента, увеличенная генерация метаболитических побочных продуктов аэробного метаболизма, дефицит железа и комбинации этих факторов. Различия в активности против разных видов *Candida*, обнаруженные в настоящем исследовании, могут быть объяснены неравной эффективностью лактоферрина из-за различий в составе клеточной стенки, чувствительности к активации ферментов или потребности в железе у отдельных видов *Candida* (24).

В нескольких исследованиях была продемонстрирована противогрибковая активность безводного лактоферрина, апо-лактоферрина, тогда как в тех же исследованиях нативная форма лактоферрина не оказывала никакого влияния на ингибирование роста *Candida* (15, 24). Однако в настоящем исследовании мы показали, что как апо-лактоферрин, так и лактоферрин способны ингибировать рост нескольких клинических изолятов *Candida*, хотя и в разной степени. Поскольку потенциальный механизм противогрибковой активности лактоферрина, а также апо-лактоферрина, вряд ли будет направлен на одно явление (24), наблюдаемые различия в активности между этими двумя белками также могут быть объяснены неравными эффектами из белков против разных видов *Candida*, из-за различий в составе клеточной стенки, чувствительности к активации ферментов или необходимости в железе у отдельных видов *Candida*.

В более раннем эксперименте мы определили содержание LPS в лактоферрине (5 мкг / мг белка). В данном эксперименте мы обнаружили, что 1000 пг LPS на мл не смогли убить виды *Candida*. Поскольку концентрации лактоферрина до 100 мг / мл действительно содержат 500 пг LPS на мл, мы можем поэтому предположить, что сам молочный белок преимущественно вызывает ингибирование видов *Candida*.

В литературе отсутствует консенсус относительно ингибирующей активности лактоферрина против видов *Candida*. Ингибирование роста *Candida* было протестировано с концентрацией белка до 20 мкг / мл, в то время как были зарегистрированы суб-MIC (концентрация противогрибковых агентов, вызывающих значительное, но неполное ингибирование роста *Candida*) в 100 мкг / мл (41) , однако точные MIC часто не определялись. Кроме того, изменяющиеся экспериментальные условия, такие как различия в составе среды, pH, температуре инкубации, времени инкубации и критериях конечной точки, а также вариабельном использовании человеческого и лактоферрина крупного рогатого скота и белкового лактоферрина (апо-лактоферрина) по сравнению с железосодержащим лактоферрином, дают полезное сравнение настоящих результатов с ранее сообщавшимися.

Многочисленные фунгистатические механизмы лактоферрина делают этот белок перспективным соединением для комбинированной терапии. Синергетически фунгистатическую активность комбинации лекарств можно ожидать, в частности, когда используемые лекарственные средства имеют разные механизмы действия. Препараты, проверенные в сочетании с лактоферрином в этом исследовании, имеют различные виды активности. Флуконазол ингибирует синтез эргостерина путем ингибирования микросомального цитохрома P450. 5-Фтороцитозин превращается либо в 5-фторридинтрифосфат, предшественник клеточной РНК, либо в 5-фтордезоксисуридиновую кислоту, являющийся мощным ингибитором тимидилатсинтазы, оба из которых ингибируют синтез ДНК грибом. Амфотерицин В, с другой стороны, взаимодействует с эргостеролом в плазматических мембранах. Кроме того, недавние публикации предполагали, что противогрибковая активность амфотерицина В также может быть опосредована окислительным повреждением (28, 36). На первый взгляд взаимодействие с эргостеролом делает амфотерицин В менее благоприятным кандидатом для комбинации с лактоферрином, который также взаимодействует с клеточной мембраной. Однако возможны различные участки взаимодействия на мембране и могут даже приводить к аддитивным эффектам.

В настоящем исследовании показана синергетическая активность между лактоферрином и несколькими фунгицидными агентами. Несмотря на то, что требование синергизма зависит от определения, можно четко заявить, что наблюдался существенный кооперативный эффект лактоферрина с флуконазолом, амфотерицином В и 5-фтороцитозином. Комбинация лактоферрина и флуконазола оказалась наиболее успешной. Значительное снижение необходимых концентраций флуконазола с добавлением лактоферрина все же привело к полному ингибированию роста, и было отмечено синергическое действие до 50% против нескольких видов *Candida*. Этот результат соответствует нескольким исследованиям, в которых сообщается, по крайней мере, о некоторой синергетической противогрибковой активности флуконазола и комбинациях других соединений. Barchiesi и др. сообщали о двукратном сокращении MIC, используя комбинацию тербинафина и флуконазола (2). Scott и др. описали синергетические противогрибковые действия флуконазола с ибупрофеном (35). Сочетание нейтрофилов или макрофагов с флуконазолом также проявляло синергический противогрибковый эффект (5, 21, 26). Было продемонстрировано, что присутствие даже 5% человеческой сыворотки в среде для анализа было достаточным для значительного усиления активности флуконазола, вероятно, вызванного наличием низкомолекулярного компонента в сыворотке (20). В этом отношении мы расширили нашу настоящую работу, добавив в среду для анализа слюну. Мы наблюдали только минимальные изменения в противогрибковой активности тестируемых соединений, тогда как изменения в аналитической среде или в pH среды анализа приводили к значительным изменениям противогрибковой

активности (15a).

Кроме того, Wakabayashi и др. сообщали о совместном воздействии лактоферрина и азолов на рост *Candida*. (41). Эти авторы сообщили о синергетической активности между лактоферрином и клотриазолом. Они продемонстрировали, что 200 мкг лактоферрина на 1 мл полностью ингибировали рост *Candida* во время инкубации в течение 17 ч, тогда как добавление клотриазола (3-12 нг / мл) уменьшало МИС лактоферрина до 50-100 мкг / мл. Было озвучено предположение, что вмешательство надлежащего мембранного синтеза клотриазола в сочетании с мембранными взаимодействиями лактоферрина объясняет наблюдаемые совместные ингибирующие эффекты клотриазола и лактоферрина. В более недавнем исследовании одна и та же группа также описала повышенную активность флуконазола в присутствии лактоферрина против устойчивости к флуконазолу штамма *C. albicans* (42).(42). В этих экспериментах авторы наблюдали синергетическую активность против роста устойчивых к флуконазолу штаммов *Candida* с 25 до 400 мкг лактоферрина на мл в сочетании с 0,12-0,25 мкг флуконазола на мл после инкубации в течение 15 ч в среде RPMI при pH 7,0. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами нашего исследования с *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. tropicalis*. С другой стороны, в более раннем исследовании эта группа не обнаружила совместных эффектов с комбинациями лактоферрина с амфотерицином В или 5-фторцитозином (41). Следует отметить, что в их анализах они использовали только концентрации до 100 мкг лактоферрина на мл, чтобы проверить влияние на МИК амфотерицина В или 5-фторцитозина. Однако в случае амфотерицина В концентрация 100 мкг лактоферрина на мл может быть слишком низкой, чтобы наблюдать значительные изменения в МИС (мы должны были использовать 500 мкг лактоферрина на мл, чтобы наблюдать любые эффекты на противогрибковую активность амфотерицина В). В случае 5-фторцитозина отсутствие кооперативного эффекта может быть вызвано различиями в чувствительности штаммов *Candida*, применяемых к тестируемым противогрибковым препаратам.

Наше исследование показывает, что комбинация лактоферрина и амфотерицина В может быть синергетичной до 30%, но также может проявлять умеренную антагонистическую активность 10% против обоих испытуемых видов *Candida*. В более раннем исследовании Nikawa и др. (23) было показано, что предэкспозиция *C. albicans* к амфотерицину В приводит к повышенной резистентности к клеточной гибели, вызванной апо-лактоферрином. Это наблюдение указывает на сходство в противогрибковых механизмах апо-лактоферрина и амфотерицина В. Однако следует понимать, что механизм ингибирования роста кандиды лактоферрином не обязательно объясняется действиями, направленными только на поверхности клеток. Кроме того, в других исследованиях предполагалось, что амфотерицин В также может оказывать противогрибковую активность путем вмешательства в клеточное окисление (28,

36). Поэтому различия в механизмах действия лактоферрина и амфотерицина В могут объяснить наблюдаемую синергетическую активность.

Аналогичные рассуждения могут быть выдвинуты для синергетической активности, которую мы обнаружили с помощью комбинации 5-фторцитозина и лактоферрина. Nikaawa и др. (23) показали, что апо-лактоферрин взаимодействует с компонентами клеточной мембраны *C. albicans*. Хотя детали этого механизма нуждаются в осветлении, взаимодействие апо-лактоферрина с клеточной мембраной может антагонизировать действие противогрибковых средств, таких как 5-фторцитозин. В нашем исследовании мы наблюдали выраженный синергетический противогрибковый эффект только с 5-фторцитозином в комбинации с лактоферрином. Эти результаты могут указывать на то, что противогрибковая активность лактоферрина вряд ли может быть вызвана взаимодействием только с клеточной мембраной.

Комбинации лекарственных средств, которые проявляют как антагонистическую, так и совместную деятельность, трудно контролировать в клинической практике, так как флуктуации их уровней в плазме и ткани трудно контролировать. Поэтому следует привлекать лактоферрин в сочетании с флуконазолом не только потому, что флуконазол обычно используется пациентами, но также потому, что эта комбинация может проявлять совместную или даже синергетическую противогрибковую активность во всем диапазоне потенциальных концентраций. При обычных режимах дозирования, значение концентрации флуконазола в слюне может достигать 2,6 мкг на мл, что значительно выше, чем его МИС против большинства клинических изолятов (9). В такой ситуации добавление лактоферрина к существующей терапии флуконазолом, по-видимому, не имеет никакой дополнительной ценности. Однако в случае резистентности *in vitro* изолята к флуконазолу, в результате чего МИС выше, чем 2,6 мкг / мл (таблица 1) (11), может стать полезным добавление лактоферрина. Наши результаты показывают, что, как флуконазол-чувствительные, так и устойчивые штаммы реагируют на добавление лактоферрина. Поэтому добавление лактоферрина к существующей терапии флуконазолом может значительно снизить применение флуконазола и / или может отложить обычное увеличение суточной дозы флуконазола за счет задержки индукции устойчивости к флуконазолу.

В более раннем исследовании, проведенном в нашей лаборатории, было определено, что концентрация лактоферрина в слюне находится в диапазоне 10 мкг / мл и не имеет существенного различия среди здоровых и ВИЧ-инфицированных лиц 1-го типа. Тем не менее, было также продемонстрировано, что в отношении ВИЧ-1-инфицированных людей преобладает большое количество *Candida* с относительно небольшим количеством лактоферрина в их слюне. На основании этого наблюдения было высказано мнение, что профилактическое лечение этих пациентов с дополнительными количествами лактоферрина является целесообразным к рассмотрению (40).

В заключение, в этом исследовании мы сообщаем о синергетической активности флуконазола в сочетании с лактоферрином *in vitro* против нескольких видов *Candida*. Клинические исследования с целью выяснения потенциальной пользы этой комбинации при антимикотической терапии продолжаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baily, G. G., F. M. Perry, D. W. Denning, and B. K. Mandal. 1994. Флуконазол-резистентный кандидоз в когorte ВИЧ. СПИД 8: 787-792.
2. Barchiesi, F., L. F. DiFrancesco, P. Compagnucci, D. Arzeni, A. Giacometti, and G. Scalise.. 1998. Взаимодействие *in vitro* тербинафина с амфотерицином В, флуконазолом и итраконазолом против клинических изолятов *Candida albicans*. J. Antimicrob. Chemother. 41: 59-65.
3. Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita.. 1993. Уничтожение *Candida albicans* лактоферрином В, мощным антимикробным пептидом, полученным из N-концевой области лактоферрина крупного рогатого скота. Med. Microbiol. Immunol. 182: 97-105.
4. Brock, J. H. 1980. Lactoferrin в материнском молоке: его роль в поглощении железа и защита от кишечной инфекции у новорожденного. Архипелаг Дис. Ребенок. 55: 417-421
5. Brummer, E., and D. A. Stevens. 1996. Синергия нейтрофилов человека с флуконазолом при уничтожении видов *Candida*. Mycopathologia 134: 115-120.
6. Bullen, J. J. 1981. Значение железа в инфекции. Rev. Infect. Дис. 3: 1127-1138.
7. Центры по контролю и профилактике заболеваний. 1997. Пересмотр определения случая эпиднадзора за CDC для синдрома приобретенного иммунодефицита. Совет государственных и территориальных эпидемиологов и СПИДа, Центр инфекционных заболеваний. Morbid. Смертельный. Еженедельный представитель 36: 1S-15S.
8. Коэн, М. С., Дж. Мао, Г. Т. Расмуссен, Дж. С. Сероди и Б. Э. Бритиган. 1992. Взаимодействие лактоферрина и липополисахарида (ЛПС): влияние на антиоксидантное свойство лактоферрина и способность ЛПС к основным человеческим нейтрофилам для улучшения образования супероксида. J. Infect. Дис. 166: 1375- 1378.
9. Force, R.W. и М. С. Nahata. 1995. Концентрация кетоконазола и флуконазола слюны: последствия для эффективности лекарственного средства при орофаринге и кандидозе пищевода. Анна. Pharmacother. 29: 10-15.
10. Gallis, H. A., R. H. Drew и W. W. Pickard. 1990. Амфотерицин В: 30-летний клинический опыт. Rev. Infect. Дис. 12: 308-329.
11. Garcia Hermoso, D., F. Dromer, L. Improvisi, F. Provost, and B. Dupont.. 1995. Концентрации флуконазола в слюне у больных СПИДом с орофарингеальным кандидозом, невосприимчивым к лечению флуконазолом. Antimicrob. Агенты Chemother. 39:

656-660.

12. Harmsen, M. C., P. J. Swart, M.-P. де Бе'тун, Р. Паувелс, Э. Де Клерк, Т. Х. и Д. К. Мейер. 1995. Противовирусные эффекты белков плазмы и молока: лактоферрин проявляет сильную противовирусную активность как при вирусе иммунодефицита человека, так и при цитомегаловирусе человека. *J. Infect. Дис.* 172: 380-388.

13. **Hood, S., and D. W. Denning.** 1996. Лечение грибковой инфекции при СПИДе. *J. Antimicrob. Chemother.* 37 (Suppl. B): 71-85.

14. **Kerridge, D., and R. O. Nicholas** 1986. Сопротивление лекарственным средствам у оппортунистических патогенов *Candida albicans* и *Candida glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 39-49.

15. **Kirkpatrick, C. H., I. Green, R. R. Rich, and A. L. Schade** 1971. Ингибирование роста *Candida albicans* железом-ненасыщенным лактоферрином: отношение к механизмам защиты хозяина при хроническом мукокутальном кандидозе. *J. Infect. Дис.* 124: 539-544. 15a. Куперы, М. Э., Х. Г. де Фриз, Дж. Хегсма, Дж. М. ван ден Берг, Д. К. Ф. Мейер и П. Дж. Сварт. Условия, влияющие на противогрибковую активность лактоферрина и противогрибковых препаратов против клинических изолятов *Candida*.

16. Langenbeck, B. 1839. Auffingung von Pilzen aus der Schleimhaut der Speiseröhre einer Typhus-Leiche. *Neue Not. Geb. Natur-u-Heilk (Froriep)* 12: 145-147.

17. Lyman, C. A. и T. J. Walsh. 1992. Системно вводимые противогрибковые средства. Обзор их клинической фармакологии и терапевтических применений. *Наркотики* 44: 9-35.

18. **Marchetti, M., C. Longhi, M. P. Conte, S. Pisani, P. Valenti, and L. Seganti.** 1996. Лактоферрин ингибирует адсорбцию вируса простого герпеса типа 1 клеткам Vero. *Antiviral Res.* 29: 221-231.

19. **Masson, P. L., and J. F. Heremans.** 1968. Металлические свойства человеческого лактоферрина (белка красного молока): участие бикарбоната в реакции. *Евро. J. Biochem.* 6: 579-584.

20. **Nassar, F., E. Brummer, and D. A. Stevens.** 1995. Различные компоненты в сыворотке человека ингибируют размножение *Cryptococcus neoformans* и повышают активность флуконазола. *Antimicrob. Агенты Chemother.* 39: 2490-2493.

21. **Natarajan, U., N. Randhawa, E. Brummer, and D. A. Stevens.** 1998. Влияние гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на кандицидную активность нейтрофилов, моноцитов или макрофагов, полученных из моноцитов, и синергию с флуконазолом. *J. Med. Microbiol.* 47: 359-363.

22. Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам. 1995. Справочный метод для исследования разведения противогрибковой чувствительности бульона для дрожжей. Ориентировочный стандарт M27-T. Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам, Вилланова, п.

23. **Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, and T. Hamada** 1994. Влияние противогрибковых агентов на *in vitro* восприимчивость *Candida albicans* к апо-

лактоферрину. 39: 921-923.

24. **Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, K. M. Pang, and T. Hamada.** 1993. Фунгицидный эффект человеческого лактоферрина на *Candida albicans* и *Candida krusei*. Архипелаг Oral Biol. 38: 1057-1063.

25. Коэффициенты, Ф. С. 1988. Кандида и кандидоз. Обзор и библиография, стр. 93-114. Baillie`re Tindall, Лондон, Великобритания.

26. **Okutomi, T., S. Abe, S. Tansho, H. Wakabayashi, K. Kawase, and H. Yamaguchi.** 1997. Увеличенное ингибирование роста *Candida albicans* нейтрофилами в присутствии лактоферрина. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18: 105-112.

27. **Oppenheim, F. G., T. Xu, F. M. McMillian, S. M. Levitz, R. D. Diamond, G. D. Offner, and R. F. Troxler.** 1988. Гистатинс, новое семейство белков гистинистеринов в секрете околоушной железы человека. Изоляция, характеристика, первичная структура и фунгистатическое действие на *Candida albicans*. J. Biol. Химреагент 263: 7472-7477.

28. **Osaka, K., V. B. Ritov, J. F. Bernardo, R. A. Branch, and V. E. Kagan.** 1997. Амфотеронин В защищает цис-паринариновую кислоту от пероксильного радикального окисления: амфотерицин В в качестве антиоксиданта. Antimicrob. Агенты Chemother. 41: 743-747.

29. Pfaller, M. A., L. Burmeister, M. S. Bartlett и M. G. Rinaldi. 1988. Многоцентровая оценка четырех методов приготовления инокулятов дрожжей. J. Clin. Microbiol. 26: 1437-1441.

30. **Plettenberg, A., A. Stoehr, G. Hoffken, C. Bergs, B. Tschechne, M. Ruhnke, W. Heise, S. Dieckmann, and W. Meigel** 1994. Флуконазол-терапия кандидоза полости рта у ВИЧ-инфицированных пациентов: результаты многоцентрового исследования. Инфекция 22: 118-123.

31. Pollock, J. J., L. Denepitiya, B. J. Mackay и V. J. Iacona. 1984. Фунгистатическая и фунгицидная активность полипептидов, богатых гистидином, околоушных слюнных почек у *Candida albicans*. Infect. Имун. 44: 702-707.

32. **Prichard, M. N., and C. Shipman, Jr.,** мл. 1990. Трехмерная модель для анализа взаимодействия лекарственных средств. Antiviral Res. 14: 181-206.

33. Reiter, B. 1983. Биологическое значение лактоферрина. Int. J. Tissue React. 5: 87-96.

34. Samaranayake, L. P. 1990. Факторы хозяина и кандидозный оральный, р. 66-103. У Л. П. Самаранаяке и Т. У. Макфарлейна. (ред.), оральный кандидоз. Райт, Лондон, Великобритания.

35. **Scott, E. M., V. N. Tariq, and R. M. McCrory.** 1995. Демонстрация синергии с флуконазолом и либо ибупрофеном, салицилатом натрия, либо пропилпарабенном против *Candida albicans* in vitro. Antimicrob. 39: 2610-2614.

36. **Sokol-Anderson, M. L., J. Brajtburg, and G. Medoff.** 1986. Амфотерицин В-индуцированный окислительный ущерб и убийство *Candida albicans*. J. Infect. Дис. 154: 76-83.

37. **Soukka, T., J. Tenovuo, and M. Lenander Lumikari.** 1992. Фунгицидный

эффект человеческого лактоферрина против *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. 69: 223-228.

38. Swart, P. J., M. E. Kuipers, C. Smit, B. W. A. van der Strate, M. C. Harmsen и D. K. F. Meijer. 1998. Лактоферрин: противовирусная активность лактоферрина, р. 205-213. В Г. Спике, Д. Легране, Дж. Мазурье, А. Пирсе и Ж. Перрадине. (ред.), Достижения в исследованиях лактоферрина. Пленум Пресс, Нью-Йорк, Н. Я.

39. **Tumbarello, M., G. Caldarola, E. Tacconelli, G. Morace, B. Posteraro, R. Cauda, and L. Ortona.** 1996. Анализ факторов риска, связанных с появлением азол-резистентного кандидоза у женщин при ВИЧ-инфекции. J. Antimicrob. Chemother. 38: 691-699.

40. van der Strate, B. W. A., M. C. Harmsen, T. H. The, H. Sprenger, M. C. Eikelboom, M. E. Kuipers, D. K. F. Meijer, P. J. Swart. Уровни лактоферрина плазмы снижаются у пациентов с конечной стадией СПИДа.

41. Wakabayashi, H., S. Abe, T. Okutomi, S. Tansho, K. Kawase, and H. Yamaguchi. 1996. Совместные антикандидозные эффекты лактоферрина или его пептидов в сочетании с азол-противогрибковыми агентами. Microbiol. Immunol. 40:821-825.

42. Wakabayashi, H., S. Abe, S. Teraguchi, H. Hayasawa, and H. Yamaguchi. 1998. Ингибирование гифального роста азоустойчивых штаммов *Candida albicans* триазольными противогрибковыми агентами в присутствии соединений, связанных с лактоферрином. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1587-1591.