

# Изучение антибактериальной активности производного фенилуксусной кислоты в отношении возбудителя холеры

\*Н. А. СЕЛЯНСКАЯ, С. Н. ГОЛОВИН

Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону

## Study of the Antibacterial Activity of Phenylacetic Acid Derivative Against the Causative Agent of Cholera

\*N. A. SELYANSKAYA, S. N. GOLOVIN

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don

Изучена активность *in vitro* и *in vivo* производного фенилуксусной кислоты — диклофенака — в отношении штаммов *V.cholerae* O1 El Tor и образованных ими биоплёнок. В присутствии субингибирующей концентрации диклофенака (250 мг/л) выявлено уменьшение в 4 раза значений минимальных подавляющих концентраций фуразолидона и левомицетина у 30% и 100% штаммов, из числа устойчивых к этим препаратам, и достоверное увеличение диаметров зон задержки роста вокруг дисков с левомицетином, фуразолидоном, стрептомицином (для всех штаммов) и доксициклином (для двух штаммов) в сравнении с контролем. В опытах *in vivo* при использовании для лечения белых мышей фуразолидона, налидиксовой кислоты, левомицетина, стрептомицина, к которым заражающий штамм был устойчив, в комбинации с диклофенаком число выживших животных увеличилось до 80% в сравнении с монотерапией этими препаратами (50% и менее). Субингибирующая концентрация диклофенака не оказывала выраженного влияния на антибиотикочувствительность биоплёнок. Исследование методом трансмиссионной электронной микроскопии биоплёнки штамма *V.cholerae* O1 El Tor 19667 после воздействия на неё диклофенаком (250 мг/л) в течение 120 ч выявило признаки разрушения экзополисахаридного матрикса. Приведённые результаты свидетельствуют о перспективах изучения данной и других групп препаратов с целью разработки новых способов преодоления резистентности бактерий.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, диклофенак, биоплёнка, антибиотикорезистентность.

The *in vitro* and *in vivo* activity of a phenylacetic acid derivative, diclofenac, was studied against *V.cholerae* O1 El Tor strains and biofilms formed by them. In the presence of a subinhibitory concentration of diclofenac (250 mg/l), a 4-fold decrease in the values of the minimum inhibitory concentrations of furazolidone and chloramphenicol was found in 30% and 100% of the strains resistant to these drugs, and a significant increase in the diameters of growth inhibition zones around discs with chloramphenicol, furazolidone, streptomycin (for all strains) and doxycycline (for two strains) in comparison with the control. Furazolidone, nalidixic acid, chloramphenicol, streptomycin, to which the infecting strain was resistant, were used in *in vivo* experiments in combination with diclofenac for the treatment of white mice; in the experimental group the number of surviving animals increased to 80% in comparison with monotherapy with these drugs (50% or less). The subinhibitory concentration of diclofenac did not have a pronounced effect on the antibiotic sensitivity of biofilms. The study using transmission electron microscopy method on the biofilm of the *V.cholerae* O1 El Tor 19667 strain after exposing it to diclofenac (250 mg/l) for 120 h revealed signs of destruction of the exopolysaccharide matrix. These results indicate the prospects for studying this group of drugs, as well as others in order to develop new ways to overcome bacterial resistance.

**Keywords:** cholera vibrio, diclofenac, biofilm, antibiotic resistance.

Использование антибактериальных препаратов для профилактики и лечения инфекций привело к распространению множественнорезистентных штаммов возбудителей. Вот уже несколько десятилетий проблема антибиотикорезистентности занимает одну из ведущих позиций мирового здравоохранения, подтверждением чему является ряд принятых на международном уровне документов. В соответствии с Глобальной стратегией Всемирной организации здравоохра-

нения по сдерживанию антибиотикорезистентности, Стратегией предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года [1, 2], наряду с рациональным использованием имеющихся антибактериальных препаратов и разработкой новых антибиотиков, поиск альтернативных средств профилактики и терапии инфекционных заболеваний является одним из приоритетных направлений современной науки. Работы в этом направлении ведутся отечественными и зарубежными учёными. Раскрытие механизмов резистентности и вирулентности бактерий, получение современных сведений о роли биоплёнкообразования в патогенезе

\*© Н. А. Селянская, С. Н. Головин, 2020

Адрес для корреспонденции: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E. mail: ppdn@inbox.ru

инфекций позволили определить новые мишени действия лекарств против возбудителей инфекционных заболеваний, что открыло большие перспективы будущих разработок.

Вспышки и эпидемии холеры с летальным исходом, вызванные штаммами возбудителя с множественной антибиотикорезистентностью, подчёркивают актуальность исследований, направленных на повышение эффективности терапии этой особо опасной инфекции. Учёным уже удалось определить вещества, которые можно использовать при разработке новых терапевтических средств. Действие одних специфически направлено на механизм вирулентности *Vibrio cholerae* [3–5], другие способны подавлять репликацию малой хромосомы *V. cholerae* [6]. У ряда препаратов обнаружены антибактериальный, антибиоплёночный эффекты, способность повышать активность антибиотиков в отношении холерного вибриона [7–9].

В зарубежных работах показано антибактериальное действие диклофенака — производного фенилуксусной кислоты, и других представителей нестероидных противовоспалительных средств в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [10, 11]. Однако данные об эффективности этих препаратов в отношении штаммов холерных вибрионов отсутствуют. В связи с этим целью нашей работы было определение активности диклофенака и его комбинаций с антибактериальными препаратами в отношении *V. cholerae* El Tor.

## Материал и методы

Из музея живых культур ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора для исследования были получены 50 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor различной эпидзначимости, выделенные в 2001–2016 гг. от людей (25) и из объектов окружающей среды (25). Контролем служил антибиотикочувствительный штамм *V. cholerae* O1 El Tor P-5879 *ctx+tcpA+toxR+* (выделен от больного, г. Таганрог, 1972 г.). При моделировании биоплёнок, а также в качестве заражающего штамма в опытах *in vivo* использовали *V. cholerae* O1 El Tor 19667 *ctx+tcpA+toxR+* (выделен от больного, г. Москва, 2012 г.), устойчивый к фуразолидону, налидиксовой кислоте, левомицетину, стрептомицину и триметоприму/сульфаметоксазолу.

Определение чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам и интерпретацию результатов проводили методом серийных разведений и диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона, pH (7,3±0,2), HiMEDIA (Индия), в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [12]. В работе использованы диклофенак, доксициклин, тетрациклин, левомицетин (хлорамфеникол), стрептомицин, гентамицин, ципрофлоксацин, фуразолидон, триметоприм / сульфаметоксазол — препараты отечественного производства; налидиксовая кислота (невиграмон, Chinoipin, Венгрия); стандартные диски с антибиотиками (производство НИЦФ).

Оценку эффективности антибактериальных препаратов *in vivo* проводили на модели генерализованной формы инфекции на беспородных белых мышах по методике, описанной ранее [13].

Сравнительное изучение эффективности антибактериальных препаратов отдельно и совместно с диклофенаком осуществляют в одном опыте, количество опытов не менее

двух при числе животных в группе не менее 10. Группы животных включали: контрольную (без лечения); группу белых мышей, которых лечили только диклофенаком; группы, которых лечили только антибактериальными препаратами (по числу препаратов, взятых в опыт); группы белых мышей, которых лечили комбинацией антибактериального препарата и диклофенака. Лечение антибактериальными препаратами и диклофенаком начинали сразу после заражения и проводили в течение 3 дней (один раз в сутки). Наблюдение за животными осуществляли 10 дней. Проводили бактериологический контроль заражения и эффективности лечения.

Дозы препаратов рассчитывали по формуле J. E. Paget, Y. M. Barnes [14], исходя из среднесуточных человекокоз.

Моделирование биоплёнок *V. cholerae in vitro* проводили на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus*, которые помещали во флаконы с речной автоклавированной водой (50 мл), контаминированной взвесью 10<sup>4</sup>/мл микробных клеток бактерий, и выдерживали при 28±2° С для получения зрелых биоплёнок в соответствии с авторской методикой [15]. Затем пластинки хитина с образовавшимися биоплёнками трёхкратного промывали в физиологическом растворе.

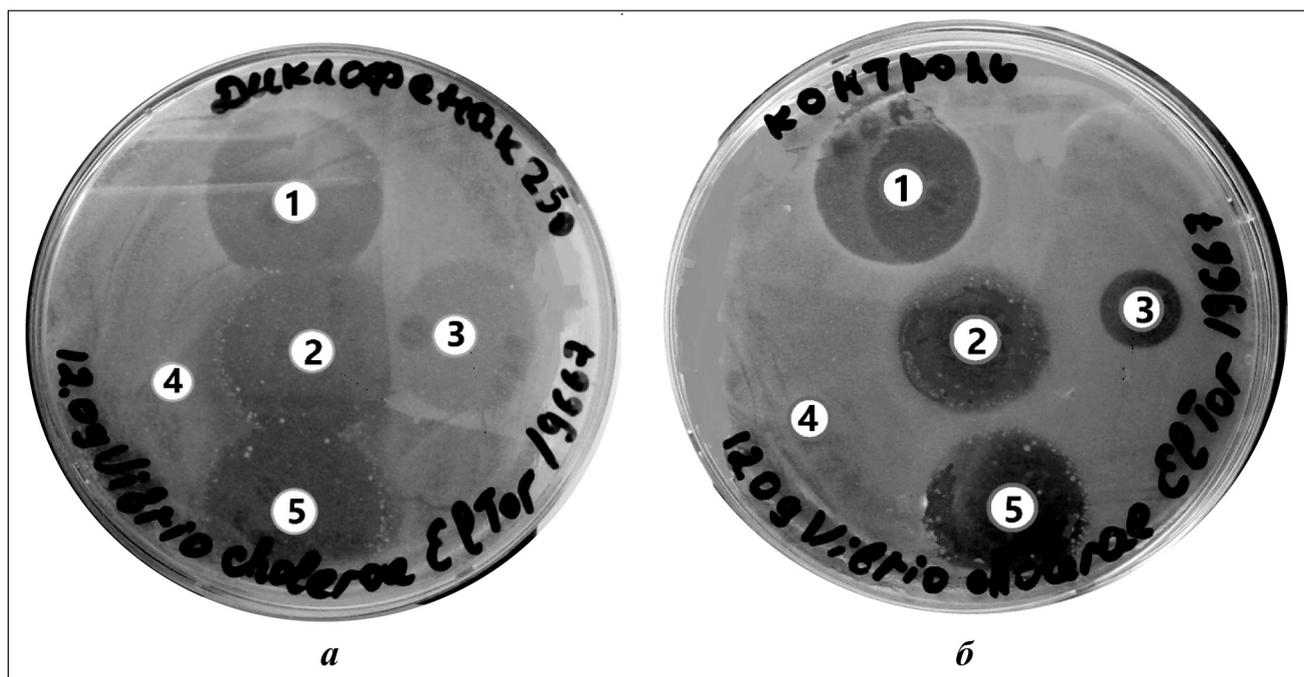
Визуализацию матрикса биоплёнок проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Jeol JEM-1011 (ТЭМ). Стандартная процедура пробоподготовки для ТЭМ включала фиксацию фрагментов экзоскелета в 2,5% растворе глутарового альдегида, постфиксацию и контрастирование 1% раствором тетраоксида осмия (OsO<sub>4</sub>), обезвоживание в растворах этанола восходящей концентрации (50°, 60°, 70°, 80°, абсолютный этанол), пропитывание эпоксидной смолой, заливку и полимеризацию блоков. Из полученных блоков с образцами при помощи ультратома изготавливали ультратонкие срезы толщиной 60–70 нм, которые монтировали на медные сеточки и контрастировали в 1% водном растворе уранилацетата и в 0,3% водном растворе цитрата свинца. После высушивания образцы исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Для определения антибиотикочувствительности пластинок хитина с биоплёнками переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения антибактериальных препаратов либо их комбинаций с диклофенаком (250 мг/л) в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера, pH 7,7). В контрольные пробы с биоплёнкой антибактериальный препарат не добавляли. Через 24 ч инкубирования в термостате (37°С) делали отпечатки биоплёнок на пластинки с агаром Хоттингера (pH 7,7) и высев по 0,1 мл из планктонной культуры. Определяли минимальные подавляющие концентрации (МПК) препаратов по наличию или отсутствию роста бактериальных клеток.

Статистическую достоверность результатов определения МПК антибактериальных препаратов подтверждали их воспроизводимостью при трёхкратном повторении эксперимента. Статистическую обработку результатов диско-диффузионного метода проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента для зависимых совокупностей [16]. Для статистической обработки данных по сравнительному изучению эффективности антибактериальных препаратов в опытах *in vivo* использовали таблицы А. Я. Боярского [17].

## Результаты исследования

На первом этапе методом серийных разведений в плотной питательной среде были определены значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) диклофенака и антибактериальных препаратов в отношении 50 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor.



**Рис. 1. Определение антибиотикочувствительности штамма *V.cholerae* O1 El Tor 19667 диско-диффузионным методом.**

*a* – чашка, содержащая диклофенак в концентрации 250,0 мг/л; *б* – контрольная чашка без диклофенака; 1 – диск с гентамицином; 2 – диск с левомицетином; 3 – диск с фуразолидоном; 4 – диск с триметопримом/сульфаметоксазолом; 5 – диск с доксициклином.

Среди изученных холерных вибрионов 22 штамма обладали резистентностью либо промежуточной устойчивостью к левомицетину, 34 штамма — к налидиксовой кислоте, 45 штаммов — к фуразолидону, 47 штаммов — к триметоприму/сульфаметоксазолу, 22 штамма — к стрептомицину.

Для штаммов холерных вибрионов, взятых в исследование, МПК диклофенака составляла 500,0–1000,0 мг/л. Исходя из этих значений, далее в опыт в качестве субингибирующей брали концентрацию диклофенака, составляющую 1/2–1/4 МПК, что соответствовало 250,0 мг/л. Несмотря на то, что эта концентрация не подавляла рост холерных вибрионов в посевной дозе  $10^6$  м.кл./мл, снижение посевной дозы и подсчёт числа колониеобразующих единиц (КОЕ) штамма *V.cholerae* O1 El Tor 19667 показал уменьшение числа КОЕ в присутствии диклофенака (250,0 мг/л) на 3 порядка, что свидетельствует о его антибактериальном действии на холерные вибрионы. По данным литературы, антибактериальное действие диклофенака связано с нарушением биосинтеза ДНК микробной клетки [18].

Следующий этап нашей работы был посвящён изучению влияния субингибирующей концентрации диклофенака (250,0 мг/л) на антибиотикочувствительность *V.cholerae*.

Следует отметить, что чувствительность разных штаммов к различным антибиотикам в присутствии диклофенака оказалась неравнозначной.

В присутствии диклофенака в 4 раза уменьшились значения МПК фуразолидона и левомицетина у 30 и 100% штаммов из числа, устойчивых к этим препаратам, соответственно. Изменения чувствительности к остальным антибактериальным препаратам в присутствии диклофенака мы не наблюдали. При этом мы не брали во внимание двукратные колебания значений МПК антибактериальных препаратов в присутствии диклофенака и без него.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о синергидном действии представителей нестероидных противовоспалительных средств с хлорамфениколом в отношении MRSA стафилококков [19]. Зарубежными исследователями описана также способность этих препаратов повышать чувствительность основных инфекционных агентов к ципрофлоксацину и гентамицину [20, 21].

Изучение действия диклофенака на антибиотикочувствительность холерных вибрионов было проведено и диско-диффузионным методом (рис. 1).

На рис. 1 представлены результаты определения антибиотикочувствительности штамма *V.cholerae* O1 El Tor 19667 диско-диффузионным методом. Видно увеличение зон задержки роста вокруг дисков с гентамицином (1), левомицетином (2), фуразолидоном (3), доксициклином (5) на чашке, содержащей диклофенак (рис. 1, *a*) в сравнении с диаметрами зон вокруг дисков с этими антибиотиками в контроле (рис. 1, *б*).

**Таблица 1. Диаметры зон задержки роста (мм) клинических изолятов холерных вибрионов Эль Тор в присутствии диклофенака и без него**

Антибактериальный препарат	Штамм <i>V.cholerae</i> El Tor							
	19242		18826		19667		19191	
	без дикло-фенака	с дикло-фенаком	без дикло-фенака	с дикло-фенаком	без дикло-фенака	с дикло-фенаком	без дикло-фенака	с дикло-фенаком
	Значения диаметров зон задержки роста*, мм							
Левомецетин	18,3±0,6	21,7±0,6	16,3±0,6	19,7±1,1	17,3±0,6	21,7±1,1	25,0±1,0	35,7±0,6
Доксициклин	19,7±0,6	21,7±0,6	18,7±0,6	20,0±0,0	19,0±1,0	20,0±1,0	18,7±0,6	21,0±1,0
Гентамицин	21,0±1,7	21,7±2,3	21,7±2,5	22,0±2,6	20,7±2,1	21,3±1,1	23,7±1,5	24,7±0,6
Стрептомицин	9,7±0,4	13,3±1,0	10,7±1,0	14,7±0,8	6,0±3,7	20,0±0,7	9,0	12,7±0,4
Налидиксовая кислота	9,0	9,3±0,6	5,3±4,7	9,7±1,1	9,3±0,6	9,7±0,6	10,0±1,0	11,3±0,6
Триметоприм/сульфаметоксазол	0	0	0	0	0	0	0	0
Фуразолидон	9,3±0,6	14,3±0,6	9,0	12,7±0,6	7,0±1,7	16,7±1,4	7,0±1,7	17,7±1,0

**Примечание.** \* – средние значения диаметров зон задержки роста, (среднее арифметическое и средняя ошибка средней), мм; серым цветом выделены колонки, в которых различия достоверны.

Измерение размеров зон задержки роста четырёх штаммов *V.cholerae* O1 El Tor показало, что присутствие в среде культивирования субингибирующей концентрации диклофенака (250,0 мг/л) сопровождалось достоверным увеличением диаметров зон задержки роста вокруг дисков с левомецетином, фуразолидоном, стрептомицином (для всех штаммов), доксициклином (для штаммов *V.cholerae* O1 El Tor 19667 и 19191) в сравнении с диаметрами зон задержки роста вокруг дисков с этими же антибиотиками на среде без диклофенака (табл. 1).

В опытах *in vivo* при лечении белых мышей, заражённых штаммом *V.cholerae* O1 El Tor 19667, наблюдалась неэффективность фуразолидона, налидиксовой кислоты, левомецетина, стрептомицина и триметоприма/сульфаметоксазола (менее 60% выживших животных), к которым заражающий штамм был устойчив (табл. 2).

Чувствительность *V.cholerae* O1 El Tor 19667 к доксициклину сопровождалась его стопроцентной эффективностью.

При монотерапии диклофенаком выживаемость белых мышей составляла 50%.

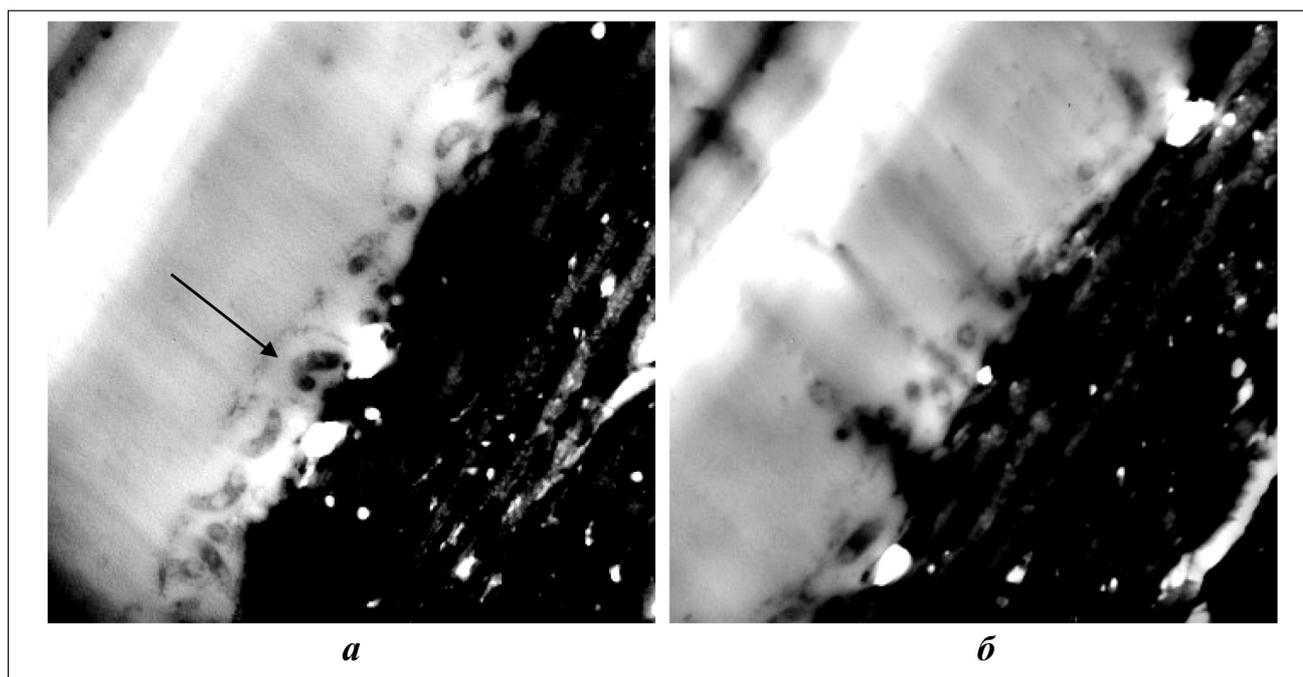
При использовании для лечения белых мышей фуразолидона, налидиксовой кислоты, левомецетина, стрептомицина совместно с диклофенаком число выживших животных увеличилось до 80%.

По нашему мнению, повышение эффективности антибактериальных препаратов при их применении совместно с диклофенаком может быть обусловлено не только его синергидным действием. Зарубежными учёными показано, что диклофенак нарушает цАМФ-активируемую и Ca(2)+-активируемую секрецию Cl<sup>-</sup> посредством ингибции апикальных каналов Cl<sup>-</sup> и базолатеральных каналов K<sup>+</sup> в эпителиальных клетках тонкого кишечника и может быть полезен при лечении холеры и секреторных диарей других типов, вызываемых кишечной гиперсекрецией Cl<sup>-</sup> [22]. Кроме того, есть сообщения о способности производного фенилуксусной кислоты в субингибирующей концентрации подавлять факторы

**Таблица 2. Эффективность комбинированной этиотропной терапии генерализованной формы холеры у белых мышей, вызванной антибиотикоустойчивым штаммом *V.cholerae* O1 El Tor 19667**

Антибактериальный препарат	Суточная доза препарата		Способ введения препарата	Выжившие животные, %±I <sub>95</sub>
	мг/мышь/сут	мг/кг/сут*		
Диклофенак	0,25	1,0	Внутрь	50±23
Доксициклин	2,0	8,0	Внутрь	100
Налидиксовая кислота	15,0	60,0	Внутрь	0
Стрептомицин	2,0	8,0	В/м*	0
Триметоприм/сульфаметоксазол	1,65/8,35	6,7/33,3	Внутрь	0
Фуразолидон	4,0	16,0	Внутрь	10
Левомецетин	10,0	40,0	Внутрь	60±23
Доксициклин+ диклофенак	2,0 0,25	8,0 1,0	Внутрь Внутрь	100
Налидиксовая кислота+ диклофенак	15,0 0,25	60,0 1,0	Внутрь Внутрь	80±18
Стрептомицин+ диклофенак	2,0 0,25	8,0 1,0	В/м* Внутрь	80±18
Триметоприм/сульфаметоксазол+ диклофенак	10,0 0,25	40,0 1,0	Внутрь Внутрь	50±23
Фуразолидон+ диклофенак	4,0 0,25	16,0 1,0	Внутрь Внутрь	80±18
Левомецетин + диклофенак	10,0 0,25	40,0 1,0	Внутрь Внутрь	80±18
Контроль без лечения		0		

**Примечание.** \* – соответствующая суточная человеческая доза; \*\* – внутримышечно.



**Рис. 2. Биоплёнки *V.cholerae* O1 EI Tor.**

Трансмиссионная электронная микроскопия, контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия, увеличение  $\times 12000$ . Стрелкой указана мембраноподобная структура на поверхности биоплёнки. *a* – без воздействия диклофенака (контроль); *б* – воздействие диклофенака 120 ч.

вирулентности бактерий, ингибируя кворум сенсинг, регулировать выработку адгезинов и токсинов, изменять энергетический обмен, pH и мембранный потенциал клетки [18, 23]. Также описано, что диклофенак улучшает проникновение фторхинолонов в воспалённые ткани [24].

Изучение действия субингибирующих концентраций диклофенака на антибиотикочувствительность биоплёнок *V.cholerae* O1 EI Tor 5879, 19243, 19667, 19613 показало, что сам по себе этот препарат вызывал гибель биоплёночной формы холерных вибрионов лишь в концентрациях, в 50 и более раз превышающих значения МПК для планктонных клеток. В субингибирующей же концентрации он не оказывал выраженного влияния на антибиотикочувствительность биоплёнок.

Вместе с тем, интерес представляют данные электронномикроскопического исследования биоплёнки штамма *V.cholerae* O1 EI Tor 19667 после воздействия на неё диклофенаком (250,0 мг/л) в течение 120 ч (5 сут). В контроле (см. рис. 2, *a*) биоплёнка до воздействия диклофенака имеет чёткую мембраноподобную структуру на границе с окружающей средой (указано стрелкой). На рис. 2, *б* наблюдается отсутствие видимой границы экзополисахаридного матрикса, а его вещество слабо выражено, что может свидетельствовать о его разрушении.

Зарубежные исследователи обнаружили *in situ* методом конфокальной лазерной сканирующей

микроскопии, что в присутствии диклофенака замедляется развитие биоплёнки по сравнению с контрольными экспериментами. Это было подтверждено невысокими показателями содержания экзополисахарида и количества клеток микроорганизмов в биоплёнках, выращенных в присутствии диклофенака [25].

### Заключение

Таким образом, проведённые нами эксперименты и данные литературы, отражающие результаты изучения действия на антибиотикостойчивые бактерии производных фенилуксусной кислоты из группы нестероидных противовоспалительных средств, свидетельствуют о наличии у них антибактериальной активности. Полученные результаты подчёркивают перспективность проведения дальнейшего изучения антимикробных и антибиоплёночных свойств данных препаратов и возможности их использования в качестве модельных соединений для синтеза новых средств против устойчивых бактерий. Такие подходы позволили бы сэкономить время и затраты на решение вопросов обеспечения безопасности и токсичности в связи с наличием ранее собранных фармакокинетических, токсикологических данных в отношении этих и других препаратов, что свидетельствует об их приоритетности при внедрении новых способов преодоления резистентности патогенов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам [интернет]. Женева: ВОЗ; 2001. / WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2001. [in Russian] Доступно по: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16343r/s16343r.pdf?ua=1> Ссылка активна на 03.10.2019.
2. Распоряжение Правительства РФ № 2045-р об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Москва, 25 сентября 2017 г. / Rasporyazhenie Pravitel'stva RF № 2045-r ob utverzhdenii Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimikrobnogo rezistentnosti v Rossijskoj Federatsii na period do 2030 goda. Moskva, 25 sentyabrya 2017 g. [in Russian]
3. Mondal S.I., Khadka B., Akter A., Roy P.K., Sultana R. Computer based screening for novel inhibitors against *Vibrio cholerae* using NCI diversity set-II: An alternative approach by targeting transcriptional activator ToxT Interdiscip Sci 2014; 6 (2): 108–117.
4. Plecha S.C., Withey J.H. Mechanism for inhibition of *Vibrio cholerae* ToxT activity by the unsaturated fatty acid components of bile. J Bacteriol 2015; 197 (10): 1716–1725.
5. Sun K., Bröms J., Lavander M., Gurrum B.K., Enquist P.A., Andersson C.D., Elofsson M. Screening for inhibition of the *Vibrio cholerae* VipA-VipB interaction identifies small molecule compounds active against type VI secretion. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58 (7): 4123–4130.
6. Yamaichi Y., Duigou S., Shakhnovich E.A., Waldor M.K. Targeting the Replication Initiator of the Second *Vibrio* Chromosome: Towards Generation of Vibrionaceae-Specific Antimicrobial Agents. PLoS Pathog 2009; 5 (11): e1000663.
7. Дуванова О.В., Мишанкин Б.Н., Титова С.В., Корнеева Л.А. Действие N-ацетила-L-цистеина на биоплёнку холерного вибриона. Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол. — 2018. — № 2. — С. 83–87. / Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Titova S.V., Korneeva L.A. Deystvie N-atsetila-L-tsisteina na bioplenki kholernogo vibriona. Zhurn mikrobiol epidemiol i immunobiol 2018; 2: 83–87. [in Russian]
8. Augustine N., Goel A.K., Sivakumar K.C., Ajay Kumar R., Thomas S. Resveratrol — a potential inhibitor of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Phytomedicine 2014; 21 (3): 286–289.
9. Leyn B., Haeckl F.P., Lington R.G. Optimized quinoline amino alcohols as disruptors and dispersal agents of *Vibrio cholerae* biofilms. Org Biomol Chem 2015; 13 (31): 8495–8499.
10. Akilandeswari K., Ruckmani K., Abirami S. Enhancement of the efficacy of antibiotics ciprofloxacin and gentamycin against gram positive and gram negative micro organism with non antibiotic nimesulide. Int J Pharm Pharm Sci 2013; 5 (3): 627–630.
11. Shirin H., Moss S.F., Kancherla S., Kancherla K., Holt P.R., Weinstein I.B., Sordillo E.M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have bacteriostatic and bactericidal activity against *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21 (9): 1388–1393.
12. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сар, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: методические указания 4.2.2495-09. — М.: 2009. — 59 с. / Opredelenie chuvstvitel'nosti vzbuditelej opasnykh bakterial'nykh infektsij (chuma, sibirskaya yazva, kholera, tulyaremiya, brutsellez, sap, melioidoz) k antibakterial'nym preparatam: metodicheskie ukazaniya 4.2.2495-09. M.: 2009; 59. [in Russian]
13. Дудина Н.А., Шутько А.Г., Рыжко И.В., Цураева Р.И., Молдаван И.А. Сравнительная оценка активности антибактериальных препаратов *in vitro* и при экспериментальной холере у белых мышей, вызванной штаммами холерного вибриона O1 и O139 серогруппы. Антибиотики и химиотер. — 2004. — № 11. — С. 23–27. / Dudina N.A., Shut'ko A.G., Ryzhko I.V., Tsuraeva R.I., Moldavan I.A. Sravnitel'naya otsenka aktivnosti antibakterial'nykh preparatov in vitro i pri eksperimental'noj kholere u belykh myshey, vyzvannoj shtammami kholernogo vibriona O1 i O139 serogruppy. Antibiotiki i khimioter 2004; 11: 23–27. [in Russian]
14. Paget J.E., Barnes Y.M. Toxicity tests. Evaluation of drug activities pharmacometric. London, 1964; 1: 135–167.
15. Патент РФ 2685878, МПК C12N 11/00. Способ моделирования биоплёнок, формируемых *V.cholerae* O1 серогрупп на поверхности хитина / Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В.; — № 2018103604; завл. 30.01.2018; опубл. 23.04.2019; Бюл. №12. / Patent RF 2685878, MPK S12N 11/00. Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruemykh *V.cholerae* O1 serogrupp na poverkhnosti khitina / Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Titova S.V.; — № 2018103604; zavl. 30.01.2018; opubl. 23.04.2019; Bjyul. №12. [in Russian]
16. <http://www.medstatistic.ru/calculators/calcpars.html>
17. Боярский А.Я. Статистические методы в экспериментальных медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1955. — 262 с. / Boyarskiy A.Ya. Statisticheskie metody v eksperimental'nykh meditsinskikh issledovaniyakh. — М.: Meditsina, 1955. — 262 s. [in Russian]
18. Riordan J. T., Dupre J. M., Cantore-Matyj S. A., Kumar-Singh A., Song Y., Zaman Sh., Horan S., Helal N.S., Nagarajan V., Elasmri M.O., Wilkinson B.J., Gustafson J.E. Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2011; 10: 30.
19. Chan E.W.L., Yee Z.Y., Raja I., Yap J.K.Y. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 10: 70–74.
20. Dutta N.K., Mazumdar K., Park J.H. In vitro synergistic effect of gentamicin with the anti-inflammatory agent diclofenac against *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol 2009; 48 (6): 783–785.
21. Akilandeswari K., Kandasamy R., Abirami S. Enhancement of the efficacy of antibiotics ciprofloxacin and gentamycin against Gram positive and Gram negative microorganism with non-antibiotic nimesulide. Intern J Pharm Pharm Sci 2013; 5 (3): 627–630.
22. Pongkorsakol P., Pathomthongtaweetchai N., Srimanote P., Soodvilai S., Chatsudthipong V., Muanprasat C. Inhibition of cAMP-Activated Intestinal Chloride Secretion by Diclofenac: Cellular Mechanism and Potential Application in Cholera. PLOS Neglected Tropical Diseases 2014; 8 (9): <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003119>.
23. Abbas H.A. Inhibition of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by diclofenac sodium. Roum Arch Microbiol Immunol 2015; 74 (3–4): 79–85.
24. Krustev S.Z., Rusenova N.V., Haritova A.M. Effect of diclofenac on ocular levels of ciprofloxacin and lomefloxacin in rabbits with endophthalmitis. Drug Dev Ind Pharm 2014; 40 (11): 1459–1462.
25. Paje M.L., Kuhlicke U., Winkler M., Neu T.R. Inhibition of lotic biofilms by Diclofenac. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 59 (4–5): 488–492.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Селянская Надежда Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментально-биологических моделей ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону

Головин Сергей Николаевич — младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону