

WPLYW STĘŻEŃ PODPROGOWYCH (SUB-MICS) ANTYBIOTYKÓW NA OSŁONY POWIERZCHNIOWE BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Dorota Wojnicz

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Akademii Medycznej
ul. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-367 Wrocław, tel. 071 784 15 12,
e-mail: wojnicz@biolog.am.wroc.pl

Wpłynęło w sierpniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę ściany komórkowej. 3. Wpływ sub-MICs antybiotyków na białka błony zewnętrznej. 4. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę otoczek. 5. Podsumowanie

The effect of subinhibitory concentrations (sub-MICs) of antibiotics on the external surface of Gram-negative bacteria

Abstract: The subinhibitory concentrations (sub-MICs) of various antibiotics are able to modify the molecular architecture of the external surface of bacteria and some bacterial functions, such as the ability to adhere to the host cell, the production of toxins, the susceptibility to host defense mechanisms and motility. It has been reported in literature that treatment of different bacteria with various antimicrobial agents at low doses results in cell wall, cytoplasmic and outer membrane as well as capsule changes. This review focuses on studies describing the effects of sub-MICs of antibiotics on the surface architecture of Gram-negative bacteria.

1. Introduction. 2. Effect of sub-MICs of antibiotics on the synthesis of cell wall. 3. Effect of sub-MICs of antibiotics on outer membrane proteins. 4. Effect of sub-MICs of antibiotics on the synthesis of capsules. 5. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki, stężenia podprogowe, osłony bakteryjne

Key words: antibiotics, subinhibitory concentrations, external surface of bacteria

1. Wstęp

Jednym z parametrów charakteryzujących relację między antybiotykiem, a drobnoustrojem jest minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC – *minimal inhibitory concentration*). Jest to najmniejsze stężenie leku, które całkowicie hamuje wzrost bakterii. Powszechnie uważa się, że dobry efekt terapeutyczny można osiągnąć wówczas, gdy pomiędzy kolejnymi dawkami leku, przez około połowę czasu, stężenie antybiotyku przewyższa wartość MIC. Często jednak w przebiegu antybiotykoterapii bakterie przez większość czasu poddane są działaniu leku o stężeniu podprogowym, czyli niższym niż MIC (sub-MIC – *sub-minimal inhibitory concentration*).

Znajomość wpływu dawek podprogowych na drobnoustroje jest bardzo przydatna, szczególnie w przypadku leków, których penetracja do pewnych tkanek i narządów jest ograniczona [13]. Przykładem tego może być penicylina benzylowa oraz antybiotyki aminoglikozydowe, których przenikanie do kości jest utrudnione, a ich stężenia są mniejsze niż MIC. Chinolony, makrolidy oraz aminoglikozydy gorzej przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego przez barierę krew-mózg. Również ograniczona jest penetracja leków aminoglikozydowych do płuc, a ich stężenie w wydzielinie drzewa oskrzelowego jest niewielkie [15].

Podprogowe stężenia leków nie zabijają bakterii, są one w stanie indukować zmiany w morfologii i strukturach powierzchniowych komórek, hamować produkcję toksyn oraz adhezję do komórek gospodarza. Znajomość wpływu dawek sub-MICs antybiotyków na drobnoustroje w połączeniu z ich parametrami farmakodynamicznymi, może okazać się bardzo przydatna w racjonalnej antybiotykoterapii. Stężenia podprogowe leków przyczyniają się jednak do wyselekcjonowania szczepów opornych, a powstawanie zmienionych morfologicznie komórek bakteryjnych utrudnia ich identyfikację [5–7, 28].

Osłony powierzchniowe bakterii Gram-ujemnych, do których zaliczany jest peptydoglikan, błona zewnętrzna i cytoplazmatyczna oraz ewentualnie otoczek, stanowią barierę ochronną, biorą one udział w transporcie substancji odżywczych do cytoplazmy, a także w usuwaniu zbędnych metabolitów na zewnątrz komórki. Dzięki tym strukturom bakterie mogą kolonizować zarówno tkanki organizmów wyższych jak i powierzchni abiotyczne. Prawidłowa struktura osłon bakteryjnych odgrywa znaczącą rolę w ochronie drobnoustrojów przed wnikaniem cząsteczek antybiotyków do ich wnętrza [16].

W poniższej pracy opisano wyniki badań, dotyczących wpływu działania sub-MICs leków na osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych (Tabela I).

Tabela I

Efekty działania sub-MICs antybiotyków i chemioterapeutyków na strukturę osłon powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych

Antybiotyk/ chemioterapeutyk	Drobnoustroj	Efekt	Piśmien- nictwo	
Cefalosporyny: ceftazydym cefotaksym ceftriakson cefodyzym cefodyzym	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek	[1, 9, 25]	
	<i>K. pneumoniae</i>	zmniejszona grubość otoczki	[19]	
Karbapenemy: imipenem meropenem panipenem biapenem	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i>	formy kuliste	[9]	
	imipenem <i>E. aerogenes</i>	zmieniona liczba OMP	[31]	
Chinolony: ciprofloksacyna	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek komórki typu „ghost” zmieniona liczba OMP zmniejszona liczba komórek posiadających otoczki	[25, 30] [30] [27] [29]	
		rufloksacyna	<i>E. coli</i> filamentacja komórek komórki typu „ghost”	[2]
		moksyfloksacyna lewofloksacyna ofloksacyna	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> filamentacja komórek zmieniona liczba OMP	[4] [18]
Aminoglikozydy: amikacyna	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek zmieniona liczba OMP zmniejszona liczba komórek posiadających otoczki	[30] [27] [29]	
	gentamycyna	<i>P. aeruginosa</i> zmniejszona grubość otoczki	[20]	
azytromycyna	<i>E. coli</i>	formy kuliste	[25]	
trimetoprim	<i>E. coli</i>	zmieniona liczba OMP	[24]	
diazepam	<i>K. pneumoniae</i>	zmieniona liczba OMP	[23]	

2. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę ściany komórkowej

Antybiotyki β -laktamowe są lekami hamującymi syntezę ściany komórkowej bakterii. Miejscem docelowym ich działania jest grupa specyficznych białek PBP (*penicillin binding proteins*), odpowiedzialnych za syntezę peptydoglikanu w obrębie bakteryjnej ściany komórkowej. PBP są enzymami o charakterze transpeptydaz, transglikozydaz i karboksypeptydaz, które uczestniczą w tworzeniu połączeń poprzecznych (sieciowania) między łańcuchami peptydoglikanu. Jednym z najlepiej poznanych białek wiążących penicylinę u *Escherichia coli* jest PBP1B. Jest ono główną transpeptydazą i transglikozylazą uczestniczącą w procesie wbudowywania nowo syntetyzowanych fragmentów peptydoglikanu do „starej” mureiny. Białko PBP1B

bierze udział w polimeryzacji mureiny z prekursorów, złożonych z disacharydopentapeptydu, oraz w tworzeniu mostków peptydowych pomiędzy sąsiednimi łańcuchami peptydowymi. W ostatnim etapie syntezy mureiny bierze udział białko PBP1A, wykazujące również podwójną aktywność enzymatyczną – transpeptydazy i transglikozylazy. Natomiast białko PBP3 uczestniczy w syntezie mureiny podziałowej (przegrodowej). Zaburzenia w funkcjonowaniu PBP3 hamuje wytwarzanie przegród wewnątrzkomórkowych i tym samym powoduje wzrost bakterii w postaci wydłużonych filamentów [3].

Zmiany w morfologii komórek bakteryjnych pod wpływem działania sub-MICs leków β -laktamowych są wynikiem zahamowania lub zaburzeń procesu syntezy składników ściany komórkowej. V r a n e s i wsp. [25] badali wpływ sub-MICs ceftazydymu na morfo-

logię komórek *E. coli*. Stężenie 1/2 MIC leku powodowało tworzenie się filamentów. Takie formy morfologiczne obecne były także w hodowlach *E. coli* poddanych działaniu sub-MICs cefodyzemu, cefotaksyemu oraz ceftriaksonu. Najwięcej zmienionych morfologicznie komórek powstawało w obecności 1/8 MIC cefodyzemu oraz 1/16 MIC cefotaksyemu i ceftriaksonu [1]. H o r i i i wsp. [9] badali wpływ 1/2 MIC ceftazydymu, imipenemu, panipenemu, meropenemu i biapenemu na komórki *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* oraz *Proteus mirabilis*. Jedynie ceftazydym indukował powstawanie filamentów, natomiast karbapenemy powodowały pojawienie się form kulistych.

Zmiany kształtu komórek bakterii były także obserwowane podczas inkubacji drobnoustrojów w sub-MICs leków z innych grup niż β -laktamy [2, 4, 25, 30]. B r a g a i wsp. [2] zaobserwowali pojawienie się krótkich filamentów o długościach od 5 do 15 μm oraz długich filamentów o długościach powyżej 15 μm w hodowlach *E. coli* w obecności sub-MICs rufloksacyny. Najwięcej zmienionych morfologicznie komórek powstawało pod wpływem 1/2 MIC po 2 godzinach inkubacji. Pozostałe stężenia – 1/4, 1/8, 1/16 i 1/32 MIC powodowały powstanie filamentów w mniejszej ilości. Ci sami autorzy zaobserwowali występowanie komórek typu „ghost”. już w 4-godzinnej hodowli pałeczek okrężnicy w obecności wszystkich sub-MICs rufloksacyny, z wyjątkiem 1/16 MIC. Zjawisko filamentacji komórek *K. pneumoniae* w obecności 1/4 i 1/8 MIC moksyflokscyny zaobserwowali D r a g o i i wsp. [4]. Pałeczki *E. coli* poddane działaniu sub-MICs ciprofloksacyny utworzyły filanty, natomiast inkubacja tych szczepów w obecności sub-MICs azytromycyny spowodowała powstanie komórek o kształtach kulistych [25]. W badaniach własnych także obserwowano znaczące zmiany w morfologii komórek *E. coli* w obecności sub-MICs ciprofloksacyny [30]. Stężenie 1/32 MIC powodowało pojawienie się w hodowli szczepu *E. coli* 998 długich filamentów. Obecne były one także w próbach zawierających 1/16 MIC (*E. coli* 353, 998 i 5643) i 1/8 MIC (*E. coli* 315, 353 i 998). Ekspozycja wszystkich badanych szczepów na 1/4 lub 1/2 MIC ciprofloksacyny powodowała powstawanie długich filamentów. Krótkie filanty obserwowano we wszystkich hodowlach poddanych działaniu sub-MICs tego fluorochinolonu. W niektórych hodowlach bakteryjnych zwrócono uwagę na obecność komórek typu „ghost”, pozbawionych częściowo ściany komórkowej. Pojawiły się one w przypadku dwóch szczepów *E. coli* poddanych działaniu 1/8 lub 1/4 MIC ciprofloksacyny, a także we wszystkich badanych szczepach inkubowanych w obecności 1/2 MIC tego antybiotyku. Natomiast w obecności sub-MICs amikacyny tylko niewielka liczba pałeczek *E. coli* ulegała wydłużeniu.

Działanie stężeń podprogowych fluorochinolonów na komórki bakteryjne związane jest z ich oddziaływaniem na kompleks DNA-gyryza. Gyryza, produkt genów *gyrA* oraz *gyrB*, współdziała z topoizomerazą typu I. Ich aktywność jest niezbędna do utrzymania superspiralnej struktury chromosomu bakteryjnego, co warunkuje właściwą replikację DNA. Inhibicja gyrazy powoduje zahamowanie procesu syntezy DNA. Fluorochinolony w stężeniach podprogowych mogą zaburzać działanie gyrazy, a w konsekwencji replikację chromosomu bakteryjnego, transkrypcję i translację białek enzymatycznych PBP1B i PBP3 biorących udział w syntezie mureiny [21]. E i c k i i wsp. [5] wykazali, że stężenia 1/4 MIC moksyflokscyny i gatiflokscyny, powodowały spontaniczne mutacje w genie *gyrA*, kodującym podjednostkę A gyrazy. Można na tej podstawie przypuszczać, że w komórkach bakteryjnych, do których wniknął lek, następuje indukcja systemu SOS składającego się z różnych genów i ich białkowych produktów, które biorą udział w reparaacji DNA. W czasie naprawy DNA zahamowane zostają podziały komórek bakteryjnych, nie tworzą się septy, a cytoplazma ulega silnej wakuolizacji [8, 11, 17, 22].

Powstawanie filamentów pod wpływem sub-MICs aminoglikozydów wiąże się z ich mechanizmem działania. Po wniknięciu do wnętrza komórki bakteryjnej cząsteczki leków wiążą się z małymi podjednostkami rybosomu (30S), czego konsekwencją może być zahamowanie powstawania kompleksu inicjującego (70S) i całego procesu biosyntezy białka. W sytuacji takiej nie powstają m.in. enzymy uczestniczące w syntezie ściany komórkowej bakterii. Związanie aminoglikozydu z podjednostką 30S może prowadzić także do zaburzeń w etapie elongacji łańcuchów białkowych, z powodu błędnego odczytywania kodonów w mRNA przez cząsteczki tRNA. Powstają wtedy cząsteczki białka ze zmienioną sekwencją aminokwasów, które w przypadku enzymów nie są w stanie spełniać swoich funkcji [14].

Przyczyną powstawania filamentów jest również brak przegród oddzielających siostrzane komórki. W ich budowie bierze udział białko FtsZ. Zaburzenie aktywności gyrazy oraz procesu translacji może powodować niewłaściwą ekspresję genu *fts*. Wówczas białko FtsZ jest syntetyzowane w zbyt małych ilościach lub z powodu zmienionej sekwencji nie może spełniać swojej funkcji [12].

3. Wpływ sub-MICs antybiotyków na białka błony zewnętrznej

U bakterii Gram-ujemnych peptydoglikan otoczony jest błoną zewnętrzną. Jej warstwa wewnętrzna zbudowana jest przede wszystkim z cząsteczek fosfolipidów,

natomiast warstwę zewnętrzną tworzą białka (OMP – *outer membrane protein*) oraz cząsteczki lipopolisacharydu. Tylko część OMP charakteryzuje się aktywnościami enzymatycznymi. Niektóre z nich pełnią ważną rolę w stabilizacji struktury błony zewnętrznej oraz w jej wiązaniu z warstwą mureiny (białko OmpA). Inne białka zwane porynami tworzą kanały dyfuzyjne.

V ä i s ä n e n i wsp. [24] badali wpływ sub-MICs trimetoprimu na białka błony zewnętrznej szczepów *E. coli*. Na proteinogramie OMP wyizolowanych z komórek inkubowanych w 1/2, 1/4 i 1/8 MIC autorzy stwierdzili obecność dodatkowego białka o masie cząst. 21,2 kDa, które nie występowało w błonie zewnętrznej szczepów nie poddanych działaniu antybiotyku. Stężenie 1/2 MIC trimetoprimu spowodowało także utratę dwóch białek w błonie zewnętrznej *E. coli*. N a k a j i m a i wsp. [18] stwierdzili obecność dużych ilości dodatkowego białka o masie cząst. 43 kDa w błonie zewnętrznej komórek *Pseudomonas aeruginosa* inkubowanych w obecności 1/2 MIC lewofloksacyny i ofloksacyny. Na proteinogramie białek wyizolowanych ze szczepu *K. pneumoniae*, który został poddany działaniu sub-MIC diazepam, zaobserwowano utratę białek o masie cząsteczkowej 34 i 36 kDa i znaczny wzrost ilości białka o masie cząst. 42 kDa [23]. Zanik białka o masie cząst. 42 kDa stwierdzono w błonie zewnętrznej szczepu *Enterobacter aerogenes* po jego inkubacji w stężeniu podprogowym imipenemu [31].

Sub-MICs tetracykliny, chloramfenikolu, gentamycyny, piperacyliny i rifampicyny nie powodowały natomiast zmian w składzie OMP *P. aeruginosa* [18]. Liczba oraz ilość białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella dysenteriae* type 1 nie uległa zmianie po inkubacji w obecności 1/2 i 1/4 MIC aminoglikozydów [10].

We wstępnych badaniach własnych określono wpływ sub-MICs amikacyny i ciprofloksacyny na obecność OMP [27]. Wykazano występowanie różnic w elektroforegramach białek szczepów *E. coli* nie poddanych działaniu leków i szczepów inkubowanych w obecności stężeń podprogowych amikacyny lub ciprofloksacyny. Przykładowo na elektroforegramie białek wyizolowanych z pałeczek *E. coli* 998 poddanych działaniu 1/2 MIC amikacyny stwierdzono obecność dwóch białek o masach cząsteczkowych 105,44 kDa i 84,15 kDa, które nie występowały w komórkach szczepu *E. coli* 998 inkubowanego w pożywce bez leku, a także stwierdzono brak 3 białek o masach cząst. 114,62 kDa, 14,51 kDa i 6,6 kDa, które były obecne w błonie zewnętrznej *E. coli* 998. Elektroforegram OMP pochodzących z komórek *E. coli* 998 hodowanych w 1/2 MIC ciprofloksacyny wskazywał na obecność czterech dodatkowych białek o masach cząst. 105,99 kDa, 84 kDa, 40,78 kDa i 29,7 kDa, a także brak 3 białek o masach cząst. 114,62 kDa, 14,51 kDa i 6,6 kDa w porównaniu z pałeczkami z hodowli kontrolnej.

Utrata lub pojawienie się nowych białek w warstwie powierzchniowej komórek *E. coli* związane jest z „odpowiedzią” pałeczek na obecność w pożywce antybiotyków. Środowisko powoduje zmianę składu struktur budujących błonę zewnętrzną. Być może, wystąpienie nowych białek w komórkach *E. coli* hodowanych w obecności sub-MICs, związane jest z częściową hydrolizą OMP obecnych w błonie zewnętrznej pałeczek nie poddanych działaniu leków. To mogłoby wyjaśnić brak niektórych białek w komórkach szczepów kontrolnych.

4. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę otoczek

Otoczka chroni komórkę bakteryjną przed wysychaniem oraz działaniem związków chemicznych. Stanowi ważny czynnik wirulencji bakterii, ponieważ zabezpiecza je przed mechanizmami obronnymi organizmu wyższego oraz utrudnia transport antybiotyków do wnętrza komórki [26].

Obserwacje prowadzone w mikroskopie elektronowym przez N o m u r a i N a g a y a m a [19] wykazały, że warstwa otoczki *K. pneumoniae* zmniejszała się pod wpływem działania 1/2 MIC cefodyzemu do 32 nm. W próbie kontrolnej grubość otoczek *K. pneumoniae* wynosiła 160 nm. O w l i a i wsp. [20] także zaobserwowali zmniejszenie się grubości otoczek wokół komórek *P. aeruginosa* pod wpływem działania 1/2 i 1/4 MIC gentamycyny.

W badaniach własnych wykazano, że sub-MICs amikacyny i ciprofloksacyny hamowały syntezę otoczek K1 przez szczepy *E. coli* [29]. Stężenie 1/2 MIC ciprofloksacyny spowodowało, że jedynie 22–36% klonów poszczególnych szczepów posiadało otoczki. Stężenie 1/2 MIC amikacyny tylko w niewielkim stopniu powodowało obniżenie odsetka komórek bakteryjnych zdolnych do syntezy antygeny K1. Brak otoczek prawdopodobnie był spowodowane zaburzeniami ekspresji genów tworzących operon *kps* przez cząsteczki leków. Brak, choćby jednego, białka związanego z syntezą NeuNAc lub transportem jego na zewnątrz komórki bakteryjnej, mogło przyczynić się do braku otoczki polisacharydowej.

5. Podsumowanie

Osłony bakteryjne należą do jednych z najważniejszych struktur komórki prokariotycznej. Chronią drobnoustroje przed działaniem czynników fizycznych i chemicznych, a także zabezpieczają je przed nadmierną utratą wody. Za pośrednictwem osłon bakterie kontaktują się ze środowiskiem zewnętrznym, pobie-

rając składniki odżywcze lub usuwając niepotrzebne związki przemian metabolicznych.

Pod wpływem działania antybiotyków w dawkach podprogowych dochodzi do zmian w strukturach powierzchniowych komórek bakteryjnych. Zaburzenia w syntezie ściany komórkowej zwykle prowadzą do powstawania form kulistych lub wydłużonych, pozbawionych sept międzypodziałowych. Zmieniony kształt komórek bakterii może utrudniać ich wstępną diagnostykę. Niskie dawki leków powodują również zaburzenia w transporcie substancji przez błony komórkowe, a niekontrolowany przepływ makrocząsteczek i jonów prowadzi to zmian homeostazy wewnątrzkomórkowej. Inkubacja bakterii w obecności dawek subinhibicyjnych może przyczyniać się także do zmniejszenia się grubości otoczki lub jej całkowitej utraty. Drobnoustroje pozbawione antygeny otoczkowego znacznie łatwiej ulegają fagocytozie i są bardziej wrażliwe na działanie antybiotyków.

Piśmiennictwo

- Braga P.C., Dal Sasso M., Maci S.: Cefodizime: effects of subinhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: comparison with cefotaxime and ceftriaxone. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 79–84 (1997)
- Braga P.C., Sala M.T., Dal Sasso M.: Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rifloxacin on bacterial virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1013–1019 (1999)
- Buijs J., Dofferhoff A.S., Mouton J.W., Wagenvoort J.H., Van der Meer J.W.: Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 344–349 (2008)
- Drago L., De Vecchi E., Nicola L., Gismondo M.R.: Evaluation of antibacterial in vitro activity of moxifloxacin and its effects on pulmonary clearance of *Klebsiella pneumoniae* in an animal experimental model. *Arzneimittelforschung*, **55**, 473–477 (2005)
- Eick S., Schmitt A., Sachse S., Schmidt K.H., Pfister W.: In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 553–556 (2004)
- Gillespie S.H., Basu S., Dickens A.L., O'Sullivan D.M., McHugh T.D.: Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 344–348 (2005)
- Henderson-Begg S.K., Livermore D.M., Hall L.M.C.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 849–854 (2006)
- Hill T.M., Sharma B., Valjavec-Gratian M., Smith J.: Sfi-independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* **179**, 1931–1939 (1997)
- Horii T., Kobayashi M., Sato K., Ichiyama S., Ohta M.: An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of Gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 435–442 (1998)
- Hostacka A., Karelova E.: Hydrophobicity and outer membrane proteins of *Shigella dysenteriae* type 1 after treatment with subinhibitory concentrations of aminoglycosides. *Folia Microbiol.* **42**, 565–568 (1997)
- Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Organizacja, funkcja i filogeneza bakteryjnego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad w DNA. *Post. Mikrobiol.* **42**, 285–300 (2003)
- Kaca W., Amano K.: Interaction and division of bacterial cells. *Post. Mikrobiol.* **40**, 31–41 (2001)
- Kaczmarczyk L., Jakoniuk P.: Efekt terapeutyczny niektórych antybiotyków w doświadczalnych zakażeniach gronkowcowych oraz jego powiązania z aktywnością in vitro antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych wobec szczepów *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **55**, 1–10 (2003)
- Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S.: Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3249–3256 (2000)
- Leone M., Sampol-Manos E., Santelli D., Grabowski S., Alliez B., Durand A., Lacarelle B., Claude M.: Brain tissue penetration of ciprofloxacin following a single intravenous dose. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 607–609 (2002)
- Markiewicz Z.: Struktura i funkcje osłon bakteryjnych. PWN, Warszawa 1993
- Mason D.J., Power E.G.M., Talsania H., Phillips I., Gant V.A.: Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2752–2758 (1995)
- Nakajima A., Hoshikawa M., Nakae T.: Antibiotic stress induces a large amount of outer membrane protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 261–265 (1998)
- Nomura S., Nagayama A.: Mechanism of enhancement of bactericidal activity of phagocytes against *Klebsiella pneumoniae* treated with subminimal inhibitory concentrations of cefodizime. *Chemotherapy*, **41**, 267–275 (1995)
- Owlia P., Behzadiyan-Nejad Q., Souri E., Sadari H.: Microscopic study of the effects of sub-inhibitory concentrations of gentamicin on capsule production of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Iran. Med.* **4**, 18–20 (2001)
- Sonstein S.A., Burnham J.C.: Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 277–289 (1993)
- Subbalakshmi C., Sitaram N.: Mechanism of antimicrobial action of indolicin. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 91–96 (1998)
- Tavio M.M., Vila J., Perilli M., Casanas L.T., Macia L., Amicosante G., Jimenez de Anta M.: Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1119–1122 (2004)
- Väisänen V., Lounatmaa K., Korhonen T.K.: Effect of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 120–127 (1982)
- Vranes J., Zagar Z., Kurbel S.: Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Chemother.* **8**, 254–260 (1996)
- Wilson J.W., Schurr M.J., LeBlanc C.L., Ramamurthy R., Buchanan K.L., Nickerson C.A.: Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* **78**, 216–224 (2002)

27. Wojnicz D.: Wstępne badania nad wpływem stężeń podprogowych amikacyny i ciprofloksacyny na występowanie białek powierzchniowych u *Escherichia coli*. W: Forum Mikrobiologów Wrocławskich. Monografia: sesja naukowa, 2005, 107–122
28. Wojnicz D.: Wpływ stężeń podprogowych antybiotyków na zdolności adhezyjne bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* **16**, 141–148 (2007)
29. Wojnicz D., Cisowska A., Jankowski S.: The effect of sub-inhibitory concentration (sub-MIC) of amikacin and ciprofloxacin on the loss of capsular antigen K1 by *Escherichia coli* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 109 (2004), 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Prague, 1–4 May 2004.
30. Wojnicz D., Kłak M., Adamski R., Jankowski S.: Influence of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on morphology and adherence ability of uropathogenic strains. *Folia Microbiol.* **52**, 429–436 (2007)
31. Yigit H., Anderson G.J., Biddle J.W., Steward C.D., Rasheed J.K., Valera L.L., McGowan J.E., Tenover F.C.: Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3817–3822 (2002)