

ЛАКТОБАКТЕРИИ И КЛЕБСИЕЛЛЫ: ДВЕ ПРОТИВОПОЛОЖНОСТИ В БОРЬБЕ ЗА ЗДОРОВЬЕ ОРГАНИЗМА

©2024 г. Л. А. ШАПОШНИКОВ^{1,2},
В. И. ТИШКОВ^{1,2}, А. А. ПОМЕТУН^{1,2,3}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва,

²Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,

³Медицинский институт, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва.

I. Введение. II. Пробиотические свойства *L. reuteri*. III. Синтез метаболитов у *L. reuteri* для оздоровительного эффекта. IV. Роль *L. reuteri* в модуляции различных систем организма. V. Бактерии рода *Klebsiella*. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

По определению ВОЗ пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина. И, хотя сама идея использования пробиотиков для пользы организма не нова, интерес к этой теме значительно возрос именно в последнее время [1]. Это может быть частично связано с увеличением резистентности патогенов к традиционным антимикробным агентам, в частности при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также с увеличивающимся желанием людей к естественным путям оздоровления организма. Как было показано, ранее, пробиотические микроорганизмы, которые, обла-

Принятые сокращения: ВОЗ – всемирная организация здравоохранения, ЖКТ – желудочно-кишечный тракт, КОЕ – колониеобразующие единицы, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, ССБ – слизистосвязывающие белки.

Адрес для корреспонденции: aapometun@gmail.com

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 23-64-10029;
<https://rscf.ru/project/23-64-10029/>.

дают полезными свойствами, включают в себя *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, а также определённые штаммы *Escherichia coli* [2].

Существуют несколько критериев, которым должен соответствовать пробиотик, чтобы его можно было считать эффективным. К ним относятся способность выживать в ЖКТ, высокая устойчивость к желудочному соку, отсутствие любых передаваемых генов резистентности к антибиотикам и способность положительным образом влиять на организм [3]. Существует несколько механизмов такого положительного эффекта. Широко распространенное обобщение, описывающее общие механизмы среди исследованных пробиотических родов, включает устойчивость к колонизации, продуцирование кислот и короткоцепочечных жирных кислот, нормализацию работы кишечника, нормализацию нарушенной микробиоты, увеличение оборота энтероцитов и конкурентное вытеснение патогенов [4]. Среди некоторых видов пробиотиков, хоть это и не так широко изучено, существует множество эффектов, некоторые из которых являются специфическими для конкретного штамма. Например, некоторые пробиотические микроорганизмы могут улучшать усвоение пищи хозяином, метаболизируя желчную соль или дополняя функции отсутствующих пищеварительных ферментов [5, 6].

Lactobacillus spp. являются одним из наиболее широко используемых пробиотиков и могут быть найдены в большом разнообразии пищевых продуктов во всём мире [7]. Род *Lactobacillus* включает в себя большую гетерогенную группу грамположительных, неспорообразующих, факультативно анаэробных бактерий. Этот род играет очень важную роль в ферментации пищи и также может быть обнаружен в ЖКТ человека и животных в различных количествах в зависимости от вида, возраста хозяина или расположения в кишечнике [8]. В 2020 году из рода *Lactobacillus* выделили отдельный род *Limosilactobacillus* и объединили в этом роду такие виды, как *L. fermentum*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. vaginalis* и другие [9]. Все виды бактерий в этом роду объединяет то, что они способны образовывать слизь из экзополисахаридов, синтезированных из сахарозы.

Исследования на животных и результаты доклинических испытаний показали, что лактобактерии могут помочь в профилактике и лечении многочисленных заболеваний желудочно-кишечного тракта. К таким заболеваниям относятся кишечные инфекции, диарея, связанная с применением антибиотиков, некротический энтероколит у недоношенных новорожденных, воспалительные заболевания кишеч-

ника, колоректальный рак и синдром раздраженного кишечника [10]. Хотя предполагается, что лактобактерии демонстрируют наибольшую пользу в желудочно-кишечный тракте, сообщалось о пробиотическом применении некоторых штаммов лактобактерий на других участках тела. К ним относятся профилактика и лечение урогенитальных заболеваний и бактериального вагиноза у женщин, атопических заболеваний, пищевой гиперчувствительности и профилактика кариеса зубов [10].

Один из видов *Limosilactobacillus*, *L. reuteri*, имеет множество полезных свойств, влияющих на здоровье хозяина, например, профилактика и/или лечение различных заболеваний. *L. reuteri* был впервые выделен в 1962 году. Он был охарактеризован как гетероферментативный вид, который растёт в атмосфере с ограниченным кислородом и колонизирует ЖКТ человека и животных [11]. Тот факт, что этот штамм обычно колонизирует желудочно-кишечный тракт, может быть причиной того, что он обладает пробиотическими свойствами. Этот организм может существовать в широком диапазоне рН среды, использует множество механизмов, которые позволяют ему успешно снижать активность патогенных микроорганизмов, и было показано, что он секретирует антимикробные посредники [12, 13].

Было показано, что *L. reuteri* действительно являются одними из природных бактерий ЖКТ человека [14]. Они попадают в ЖКТ в самом начале жизни через грудное молоко [15]. Эти бактерии естественным образом обитают в широком спектре позвоночных животных, включая свиней, грызунов и кур. Фактически, они прошли долгую эволюцию и превратились в адаптированные к хозяину линии бактерий [16, 17]. Этот организм чаще всего обнаруживается в ближнем пищеварительном тракте хозяина [18]. В нескольких исследованиях была проведена оценка безопасности этого организма у взрослых, детей, младенцев и даже среди ВИЧ-инфицированной популяции [13, 19, 20]. Результаты показали, что доза, достигающая $2,9 \times 10^9$ колониеобразующих единиц (КОЕ) в день, всё ещё хорошо переносилась, была безопасной и эффективной для людей. Также существуют исследования, в которых перечисляются преимущества *L. reuteri* в качестве пробиотика. Эти преимущества включают укрепление здоровья, уменьшение числа инфекций, улучшение толерантности к корму у животных, усиление усваивания питательных веществ, минералов и витаминов, модулирование иммунных реакций хозяина, повышение целостности слизистой оболочки кишечника и уменьшение транслокации бактерий [21–23].

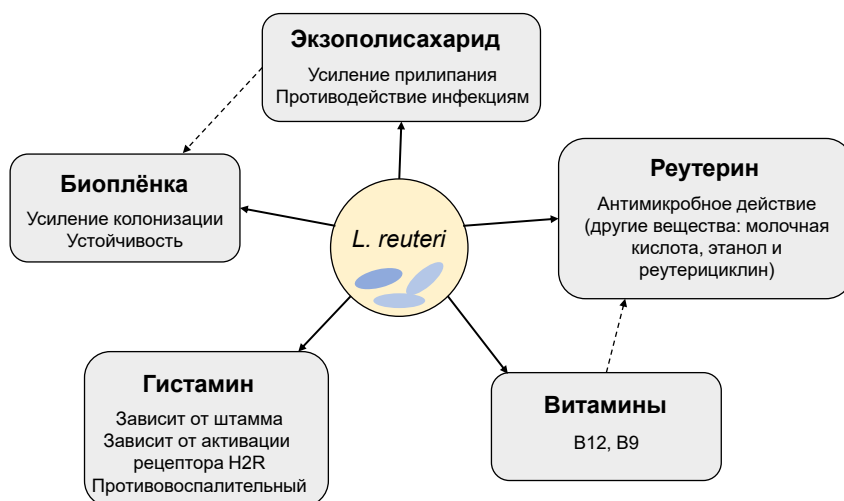
Больничные инфекции в настоящее время являются серьёзной проблемой поскольку множество пациентов стационаров имеет ослабленный иммунитет. Кроме того, штаммы внутрибольничных инфекций как правило, высоко резистентны к используемым антибиотикам. Одними из возбудителей различных опасных заболеваний являются бактерии рода *Klebsiella*. Эти патогены вызывают пневмонию, сепсис, воспаление мочеиспускательной системы, проблемы с печенью и почками, а резистентность их к антибиотикам с каждым годом возрастает [24]. Кроме этого, было обнаружено, что бактерии данного рода, поражая организм, переходят в форму биоплёнки, и обычные дозы «традиционных» антибиотиков и других антимикробных препаратов полностью уничтожить их не могут [25].

Недавно было показано, что некоторые штаммы *Lactobacillus* оказывают губительное действие на бактерии рода *Klebsiella* [26]. Лактобактерии содержатся в кишечнике здорового человека, а потому их применение не вызывает иммунный ответ. В работе [26] был проведён протеомный анализ некоторых видов бактерий *Lactobacillus* и было обнаружено, что при совместном культивировании с клебсиеллами исследованные штаммы синтезируют ряд новых ферментов. Найденные ферменты условно можно подразделить на три основные группы: 1) ферменты, гидролизующие клеточную стенку бактерий; 2) ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты и 3) ферменты клеточного метаболизма. В совокупности эти ферменты помогали лактобактериям проявлять бактерицидное действие по отношению к биопленкам клебсиелл.

Данный обзор направлен на освещение и анализ особенностей строения и метаболизма клебсиелл и лактобактерий (прежде всего *L. reuteri*) с целью объяснить потенциальное антибактериальное действие последних, предположить механизм этого действия и рассмотреть возможности потенциального применения комплекса синтезируемых ферментов в качестве антибактериального препарата против клебсиелл.

II. ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *L. REUTERI*

Существуют некоторые базовые факторы для того, чтобы рассматриваемый штамм мог бы быть потенциальным пробиотиком: выживаемость в среде с низким рН и присутствием ферментов, способность прикрепляться к эпителию для взаимодействия между хозяином и пробиотиком, конкуренция с патогенными микроорганизмами. *L.reuteri* отвечает всем этим требованиям. Следует рассмотреть

Рис. 1. Пробиотические свойства *L. reuteri*.

дополнительные пробиотические свойства *L. reuteri*, которые способствуют его разнообразному благоприятному воздействию на здоровье хозяина, а также на профилактику и/или улучшение состояния организма (рис. 1).

КОЛОНИЗАЦИЯ КИШЕЧНИКА БАКТЕРИЯМИ *L. REUTERI*

Некоторые участки ЖКТ, участвующие в пищеварении и абсорбции, имеют очень неблагоприятные условия для колонизации микроорганизмами. Например, это низкая величина pH, вызванная желудочными кислотами и солями желчи в верхней части тонкой кишки. Поэтому, прежде всего для того, чтобы колонизировать ЖКТ, нужно выживать в таких условиях. Многие штаммы *L. reuteri* устойчивы к низким значениям pH и солям желчи [27, 28]. Считается, что эта устойчивость по крайней мере частично зависит от способности этих бактерий образовывать биоплёнки [29].

L. reuteri способны прикрепляться к муцину и эпителию кишечника, а некоторые штаммы могут прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника у ряда позвоночных хозяев [23]. Возможным механизмом адгезии является связывание бактериальных поверхностных молекул со слоем слизи. Слизистосвязывающие белки (ССБ, MUB) и ССБ-подобные белки, кодируемые *Lactobacillales*-специфичными кластерами генов, кодирующих ортологичный белок, служат в качестве медиа-

торов адгезии или так называемых адгезинов [30, 31]. Значительное разнообразие ССБ среди штаммов *L. reuteri* и различия в численности ССБ на клеточной поверхности коррелируют со способностью этих бактерий связывать слизь [32]. Специфичная для штамма роль ССБ в распознавании слизистых элементов и/или их способности стимулировать агрегацию может объяснить вклад ССБ в способность *L. reuteri* связываться с кишечником. Факторы, которые помогают прикрепляться к поверхностям, включают многочисленные крупные поверхностные белки [33], MUB A [34], глюкозилтрансферазу A (GtfA) и инулосахаразу (Inu) [35] и сложный эфир D-аланина [36].

Поскольку *L. reuteri*, обитающие в ЖКТ хозяина, могут образовывать биоплёнки, были предприняты попытки изучить регуляцию образования биоплёнки *L. reuteri* и её связь с присоединением бактерий к эпителию ЖКТ хозяина. Проводя анализ биопленки *in vitro*, был раскрыт вклад GtfA и Inu в формирование биоплёнки *L. reuteri* TMW1.106 [35]. Образование *in vivo* биоплёнки штаммов *L. reuteri*, по-видимому, зависит от происхождения штаммов-хозяев. В одном исследовании девять штаммов *L. reuteri*, выделенных от разных хозяев (человека, мыши, крысы, курицы и свиньи), давали мышам без кишечной микрофлоры, получившиеся биоплёнки оценивали через 2 дня. Оказалось, что только штаммы, выделенные из грызунов, были способны образовывать биоплёнки и прилипать к эпителию переднего желудка, хотя популяции кишечного просвета были сопоставимы среди штаммов различного происхождения [18]. Другое исследование показало, что специализированный транспортный путь (система SecA2-SecY2) уникален у штаммов, выделенных из грызунов и свиней [37]. Используя штамм грызунов *L. reuteri* 100-23, провели сравнение внеклеточных и связанных с клеточной стенкой белков между штаммом дикого типа и мутантом secA2. У мутанта secA2 отсутствовал только один поверхностный белок *L. reuteri* 70902. Исследования колонизации *in vivo* показали, что отсутствие *L. reuteri* 70902 приводит к почти полностью исключённому образованию биоплёнки. Это свидетельствует о том, что *L. reuteri* 70902 и система SecA2-SecY2 являются ключевыми факторами, регулируемыми продукцию биоплёнки из *L. reuteri* 100-23 у мышей, не содержащих данных микроорганизмов [18]. Также была исследована роль двухкомпонентных систем bfrKRT и semAKR в формировании биоплёнки *in vitro* *L. reuteri* 100-23 [38]. Было обнаружено, что делеция определенных генов в оперонах усиливает адгезию и образование биоплёнки. Тем не менее, вклад систем bfrKRT и semAKR в формирование биоплёнки *in vivo* ещё предстоит выяснить. Роль экзополисахарида

(ЭПС, EPS) в содействии колонизации была также исследована с *L. reuteri* 100-23. Экспрессия EPS была исключена из-за мутации гена фруктозилтрансферазы (FTF) [39]. После введения мышам, не имеющим лактобактерии, по сравнению со штаммом дикого типа колонизация мутанта FTF в переднем желудке и слепой кишке была в значительной степени нарушена. Это указывает на то, что продукция EPS может усиливать колонизирующую способность штамма 100-23 в кишечнике. Интересно то, что *L. reuteri* RC-14 способен проникать в зрелую биоплёнку кишечной палочки и становиться её частью [40]. *L. reuteri* был также доставлен в виде биоплёнки на микросфере, и было обнаружено, что такая доставка способствует прилипанию *L. reuteri* к кишечному эпителию и повышает его пробиотические свойства [41, 42].

III. СИНТЕЗ МЕТАБОЛИТОВ У *L. REUTERI* ДЛЯ ОЗДОРОВИТЕЛЬНОГО ЭФФЕКТА

Антимикробные и иммуномодулирующие эффекты штаммов *L. reuteri* связаны с их профилем синтеза метаболитов. Стоит рассмотреть эти метаболиты и их пробиотическое действие подробнее.

РЕУТЕРИН

Большинство штаммов *L. reuteri* человеческого и птичьего происхождения способны продуцировать и выделять хорошо известное антимикробное соединение реутерин [43–45]. Реутерин представляет собой смесь различных форм 3-гидроксипропиональдегида (3-ГПА) [46]. Известно, что *L. reuteri* может метаболизировать глицерин с образованием 3-ГПА в кофермент В12-зависимой, опосредованной глицерином, дегидратазной реакции [47, 48]. Образование 3-ГПА также было продемонстрировано у нескольких других видов бактерий [49]. Тем не менее, *L. reuteri* уникальны своей способностью продуцировать и секретировать 3-ГПА больше, чем нужно клетке биоэнергетически [50]. Более того, антимикробная активность реутерина, по-видимому, зависит от самопроизвольного превращения 3-ГПА в цитотоксический электрофил акролеин [51]. Реутерин может ингибировать широкий спектр микроорганизмов, в основном грам-отрицательных [52]. Очевидно, что большая часть видов бактерий *Lactobacillus* устойчива к реутерину, среди них наиболее устойчивы штаммы *L. reuteri* [44]. В дополнение к своему антимикробному действию реутерин способен конъюгировать гетероциклические амины, что также, по-видимому, зависит от образования акролеина

[51]. Это говорит о том, что акролеин является важным соединением в активности реутерина.

Кроме реутерина, были определены некоторые другие противомикробные вещества, такие как молочная кислота, уксусная кислота, этанол и реутерициклин как продукты некоторых штаммов *L. reuteri* [45]. Наличие этих веществ показало, что *L. reuteri* эффективны против различных бактериальных инфекций ЖКТ. Эти инфекции включают *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Clostridium difficile* и *Salmonella* [53, 54]. Одним из наиболее ярких примеров эффективности *L. reuteri* в качестве пробиотика против инфекций является использование *L. reuteri* для борьбы с *H. pylori*. Инфекция *H. pylori* является основной причиной хронического гастрита и язвенной болезни, а также фактором риска злокачественных новообразований желудка [55, 56]. Действие *L. reuteri* на *H. pylori* было изучено во многих исследованиях (Таблица 1). Предполагается, что *L. reuteri* конкурирует с *H. pylori* и ингибирует его связывание с гликолипидными рецепторами [57]. Конкуренция снижает бактериальную нагрузку *H. pylori* и уменьшает связанные с ней симптомы [58]. Некоторые исследования показали, что *L. reuteri* обладает потенциалом для полного уничтожения *H. pylori* [59]. Следует отметить, что *L. reuteri* хорошо подходит для лечения *H. pylori*, так как эти бактерии уничтожают патоген, не вызывая общих побочных эффектов, связанных с терапией антибиотиками [60].

Были также проведены исследования для определения положительного действия *L. reuteri* против вирусов и грибов. Есть данные, свидетельствующие о преимуществах *L. reuteri* при использовании и против пневмовирусов, цирковирусов, ротавирусов, коксаки-вирусов и папилломавирусов [68–70]. Предположительно, *L. reuteri* противодействуют вирусной инфекции, регулируя микробиоту и секретируя метаболиты, которые имеют противовирусные компоненты [71]. Кроме того, некоторые исследования показывают, что *L. reuteri* также могут обладать противогрибковыми свойствами, так как *L. reuteri* останавливают рост и в конечном итоге убивают различные виды *Candida* [72].

ГИСТАМИН

Некоторые штаммы *L. reuteri* способны превращать аминокислоту L-гистидин, компонент пищи, в биогенный амин гистамин [45]. Комменсальную бактерию человека *L. reuteri* 6475 использовали в качестве модельного штамма для изучения образования и роли гистамина у *L. reuteri*. Было обнаружено, что гистамин, полученный из *L. reuteri* 6475, подавляет выработку фактора некроза опухоли (TNF) из стимулированных человеческих моноцитов [73]. Это подавление

Таблица 1. Клиническая эффективность *L. reuteri* против *H. pylori*

Штамм	Лечение	Субъекты	Результат	Ссылка
<i>L. reuteri</i> DSM 17648	14 дней	Взрослые	Уменьшение патогенной нагрузки в ЖКТ	[61]
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	20 дней	Пациенты	На 93% успешное уничтожение патогена с применением ингибитор-тетрациклин-метронидазол – <i>L. reuteri</i> терапии	[62]
	8 недель	Пациенты	Уменьшение уреазной активности в терапии пантопразолом	[63]
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	10 дней	Больные дети	Улучшение симптомов инфекции ЖКТ	[64]
	7 дней	Пациенты	Нет улучшений в стандартной тройной терапии	[65]
	4 недели	Пациенты	Значительное уменьшение патогенной нагрузки и улучшение симптомов диспепсии	[58]
<i>L. reuteri</i> SD2112	4 недели	Пациенты	Уменьшение количества патогена и подавление уреазной активности	[66]
<i>L. reuteri</i> DSMZ 17648	14 дней	Пациенты	Уменьшение патогенной нагрузки	[67]
<i>L. reuteri</i> DSM 17938, ATCC PTA 6475	Во время терапии	Пациенты	Уменьшение побочных эффектов от антибиотиковой терапии	[60]

зависело от активации гистаминового H_2 -рецептора, увеличения внутриклеточного цАМФ и протеинкиназы А и ингибирования передачи сигналов MEK/ERK. Синтез гистамина и последующая функция подавления TNF *in vitro* регулируются с помощью полного кластера хромосомного гена гистидиндекарбоксилазы (*hdc*), который содержит гены *hdcA*, *hdcB* и *hdcP* [73]. Также было обнаружено, что пероральное введение *hdc*⁺ *L. reuteri* может эффективно подавлять воспаление кишечника на модели индуцированного тринитробензолсульфонокислотой (TNBS) мышинного колита [74]. Кроме того, внутрибрюшинное введение супернатанта культуры *L. reuteri* 6475 мышам, которым до этого вводили TNBS, приводила к аналогичному

ослаблению колита. Эти результаты указывают на участие метаболитов *L. reuteri*, включая гистамин, в иммуномодуляции кишечника [75]. Дальнейшие исследования показали, что ген *rsiR* необходим для экспрессии кластера генов *hdc* в *L. reuteri* 6475 [76]. Инактивация гена *rsiR* приводила к снижению ингибирования TNF *in vitro* и снижению противовоспалительной функции *in vivo*. Кроме того, как подавление TNF *in vitro*, так и антиколитовые эффекты *in vivo*, по-видимому, регулируются геном *folC2* [75]. Нокаут гена *folC2* привел к подавлению кластера генов *hdc* и уменьшению производства гистамина. Производство гистамина *L. reuteri* сильно зависит от штамма, и большинство исследований было сосредоточено на штаммах человеческого происхождения [44].

ВИТАМИНЫ

Существует 13 незаменимых витаминов для человека из-за неспособности человеческого организма их синтезировать [77]. Как и многие другие виды *Lactobacillus*, некоторые штаммы *L. reuteri* способны продуцировать различные типы витаминов, включая витамин B12 (кобаламин) и B9 (фолат). Как упоминалось ранее, B12 важен для производства реутерина, потому что превращение глицерина в 3-ГПА требует B12-зависимого кофермента. К настоящему времени было обнаружено, что по меньшей мере 4 штамма *L. reuteri* с различным происхождением продуцируют B12 [78]. Среди этих штаммов наиболее изучены *L. reuteri* CRL1098 и *L. reuteri* JCM1112 [79]. Было показано, что введение *L. reuteri* CRL1098 вместе с диетой, в которой не хватает витамина B12, улучшает патологию у беременных самок мышей с дефицитом B12 и их потомства [80]. Это указывает на потенциальное применение *L. reuteri* при лечении дефицита B12. В дополнение к B12, фолат также может быть синтезирован некоторыми специфическими штаммами *L. reuteri*, включая *L. reuteri* 6475 и *L. reuteri* JCM1112 [75].

ЭКЗОПОЛИСАХАРИД (EPS)

EPS, продуцируемый *L. reuteri*, важен для формирования биоплёнки и адгезии *L. reuteri* к эпителиальным поверхностям [29]. Кроме того, EPS, синтезированный *L. reuteri*, способен ингибировать адгезию *E. coli* к эпителиальным клеткам свиньи *in vitro* [81]. Что ещё более важно, EPS-опосредованная блокировка адгезии также подавляет экспрессию генов провоспалительных цитокинов, которые индуцируются инфекцией *E. coli*, включая IL-1 β и IL-6. Дальнейшие эксперименты *in vivo* на поросятах показали аналогичные результаты

в том, что EPS, происходящий из *L. reuteri*, предотвращал диарею поросят при бактериальной инфекции путем снижения адгезии *E. coli* [82]. Кроме того, EPS из *L. reuteri*, как сообщается, подавляет связывание энтеротоксигенной кишечной палочки с эритроцитами свиньи [83]. Также было показано, что EPS, продуцируемый *L. reuteri* 100-23 из грызунов, индуцирует Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки (Treg) в селезёнке [39]. Напротив, штамм *L. reuteri* 100-23 с мутацией *ftf*, которая блокирует производство EPS, не индуцировал селезёночные Treg-клетки. Это говорит о том, что EPS необходим для опосредованной *L. reuteri* индукции клеток Treg и указывает на возможность использования дикого типа *L. reuteri* 100-23 для лечения дефицита Treg.

IV. РОЛЬ *L. REUTERI* В МОДУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА

МОДУЛЯЦИЯ МИКРОБИОТЫ ХОЗЯИНА ШТАММОМ *L. REUTERI*

Микробиота и иммунная система взаимодействуют для поддержания гомеостаза тканей у здоровых людей [84]. Многие заболевания связаны с нарушением микробиоты [85], тогда как было продемонстрировано, что восстановление микробиоты предотвращает или облегчает некоторые заболевания [86]. *L. reuteri* может влиять на разнообразие, состав и метаболическую функцию кишечных, оральных и вагинальных микробиот. Эти эффекты в значительной степени специфичны для штамма [87, 88].

Микробиота кишечника

Исследования показали модулирующее действие *L. reuteri* на микробиоту грызунов, поросят и людей. В одном из исследований оценивалось пероральное введение штамма *L. reuteri* человеческого происхождения (DSM17938) мышам, страдающим отёчностью, у которых наблюдается микробный дисбиоз кишечника вследствие мутации гена *foxp3*. Результаты показали, что этот штамм *L. reuteri* был способен продлить продолжительность жизни мышей и уменьшить воспаление многих органов при ремоделировании микробиоты кишечника [89]. Изменения кишечной микробиоты включали увеличение в типе *Firmicutes* и родах *Lactobacillus* и *Oscillospira*. Эффект *L. reuteri*, уменьшающий заболевание, был обусловлен изменённой микробиотой кишечника, хотя состав сообщества по-прежнему отличался от однопомётных особей дикого типа. Дальнейшие исследования показали, что продуцирование инозина усиливалось микробиотой кишечника при введении *L. reuteri*. При

взаимодействии с аденозиновым рецептором A_{2A} инозин может восстанавливать клетки Th_1/Th_2 и связанные с ними цитокины. Эти результаты позволяют предположить, что ось рецептора A_{2A} *L. reuteri* – кишечная микробиота – инозин – аденозин служит потенциальным терапевтическим методом для Treg-дефицитных нарушений. Кроме того, пероральное введение *L. reuteri* 6475 привело к большему разнообразию микробиоты как в тонкой, так и в подвздошной кишке на примере мышей с индуцированной овариэктомией потери кости [90]. Однако вопрос о том, была ли изменённая микробиота кишечника напрямую связана с профилактикой потери костной массы, требует дальнейшего изучения. Также было показано, что *L. reuteri* C10-2-1 влияет на разнообразие кишечной микробиоты в подвздошной кишке крыс [91].

По сравнению с младенцами, родившимися вагинально, дети, родившиеся с помощью кесарева сечения, имеют более высокую распространенность энтеробактерий, но меньше бифидобактерий в микробиоте кишечника [88]. При лечении детей в возрасте от 2 недель до 4 месяцев, родившихся кесаревым сечением, *L. reuteri* DSM 17938 модулировал развитие кишечной микробиоты таким же образом, как и у детей, родившихся традиционным способом [88]. Структура кишечной микробиоты у детей, родившихся через влагалище, оставалась неизменной при добавлении *L. reuteri*. В другом исследовании лечение детей тем же штаммом *L. reuteri* приводило к снижению анаэробных грамотрицательных и повышению грамположительных бактерий в кишечной микробиоте, тогда как численность энтеробактерий и энтерококков в значительной степени снижалась при обработке *L. reuteri* [92]. Различия в возрасте младенцев, продолжительности лечения, путях введения и дозировке могут объяснить различия в результатах двух исследований.

Для взрослых людей *L. reuteri* NCIMB 30242, вводимый в виде капсул с пролонгированным высвобождением в течение 4 недель, был способен увеличить соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* у здоровых людей [93]. Известно, что этот штамм *L. reuteri* способен активировать гидролазу солей желчных кислот и, таким образом, влияет на увеличение циркуляции желчных кислот [94]. Повышенная регуляция циркулирующей желчной кислоты была предложена в качестве причины модулированной кишечной микробиоты [94]. У пациентов с сахарным диабетом 2 типа несмотря на то, что 3 месяца приема *L. reuteri* DSM 17938 значительно не изменили микробную структуру кишечника, повысился индекс чувствительности к инсулину и сывороточный уровень вторичной желчной дезоксихолевой кислоты

[95]. Кроме того, введение штамма *L. reuteri* DSM 17938 пациентам с муковисцидозом (МВ) помогло при дисбактериозе микробиоты кишечника, уменьшив содержание протеобактерий, а также увеличив относительную численность *Firmicutes* [96]. Однако вопрос о том, способствовала ли модулированная микробиота кишечника улучшению здоровья желудочно-кишечного тракта у пациентов с МВ, получавших пробиотики, требует дальнейшего изучения.

L. reuteri влияет на микробиоту кишечника у поросят специфическим для штамма образом. Например, пероральное введение *L. reuteri* ZLR003 способно изменить как разнообразие, так и количественный состав кишечной микробиоты [97]. Однако введение штамма *L. reuteri* I5007 не повлияло на микробную структуру толстой кишки у поросят [98]. Корм, ферментированный *L. reuteri*, изменил численность 6 различных бактериальных таксонов, в частности семейства *Enterobacteriaceae*, у поросят-отъёмышей [99]. Тем не менее, основные изменения, включая увеличение числа *Mitsuokella* и уменьшение семейства под типом *Bacteroidetes*, можно было увидеть только с *L. reuteri* TMW1.656, а не с *L. reuteri* LTH5794. TMW1.656 является штаммом, продуцирующим реутерициклин, а LTH5794 – нет, что свидетельствует о возможном вкладе реутерициклина в модуляцию кишечной микробиоты у поросят [99].

Микробиота полости рта

Бактерии типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* наиболее распространены в микробиоме ротовой полости человека [100]. В рандомизированном контролируемом исследовании 12-недельное ежедневное потребление двух штаммов *L. reuteri* – DSM 17938 и РТА 5289 – привело к изменению состава микробиоты полости рта, хотя разнообразие видов бактерий не изменилось [100]. Изменения исчезли через 4 недели после прекращения лечения, что указывает на быструю смену микробиома полости рта. В другом исследовании, проведенном на человеке, оральное лечение *L. reuteri* уменьшало количество пародонтальных патогенов в субгингивальной микробиоте, хотя клинического воздействия не наблюдалось [101].

Микробиота влагалища

Лактобактерии доминируют во влагалищном бактериальном сообществе здоровых женщин [102]. Было показано, что только 14 дней перорального введения *L. reuteri* RC-14 могут восстановить нормальную микрофлору влагалища у женщин в постменопаузе [103]. Относительная распространенность лактобактерий в значи-

тельной степени снижается у пациентов с бактериальным вагинозом [102]. В общей сложности 4 недели приема внутрь капсул, содержащих два штамма, включая *L. reuteri* RC-14, увеличили относительную распространенность лактобактерий. Подобное увеличение лактобактерий наблюдалось, когда *L. reuteri* RC-14 вводили вагинально вместе со штаммом *L. rhamnosus* [104]. Тем не менее, у беременных женщин пероральное лечение *L. reuteri* RC-14 в течение 8 недель не привело к эффективному восстановлению нормальной микробиоты влагалища [105]. Это говорит о том, что *L. reuteri* RC-14 не может действовать в одиночку.

РОЛЬ *L. REUTERI* В ИММУНОМОДУЛЯЦИИ

L. reuteri способны повышать уровни свободного секреторного IgA (sIgA) у крыс [106]. Однако повышенная регуляция sIgA отсутствовала у крыс с дефицитом витамина А, что позволяет предположить, что *L. reuteri* функционируют зависимым от витамина А образом. У беременных потребление *L. reuteri* не влияло на уровни общего IgA или sIgA в грудном молоке [107]. Что касается действия *L. reuteri* на индукцию слюнного IgA, результаты противоречивы. Повышенные уровни IgA в слюне человека отмечались с использованием жевательной резинки, содержащей *L. reuteri* [108]. Однако в другом исследовании было показано, что *L. reuteri* не влияют на концентрацию IgA в слюне [109]. Разница в штаммах *L. reuteri*, использованных в исследованиях, может объяснить разницу в результатах. Важной общностью является то, что слюнные *L. reuteri*-позитивные индивидуумы имеют более высокие уровни слюнного IgA. Влияют ли *L. reuteri* на уровни IgA путём прямой регуляции В-клеток, требует дальнейшего изучения.

Было показано, что *L. reuteri* могут индуцировать противовоспалительные клетки Treg, что, вероятно, способствует благоприятному действию *L. reuteri* в широком диапазоне как медицинских, так и немедицинских заболеваний (Таблица 2). Treg-индуцирующее свойство *L. reuteri* в значительной степени зависит от штамма. Однако противовоспалительное действие *L. reuteri* не всегда зависит от индукции клеток Treg. Хорошим примером является опосредованное *L. reuteri* подавление ответов Th₁/Th₂ у Treg-дефицитных мышей [89]. Некоторые штаммы *L. reuteri* способны снижать выработку многих провоспалительных цитокинов. Например, *L. reuteri* GMNL-263 может снижать сывороточные уровни MCP-1, TNF и IL-6 у мышей, которых кормят рационом с высоким содержанием жира [110]. Схожие эффекты наблюдались и у мышей, получавших убитый нагреванием GMNL-263. Однако в некоторых случаях иммуномодулирующее действие *L. reuteri* зависит от его метаболитов, поскольку культуральный

Таблица 2. Индукция клеток Treg с помощью *L. reuteri* при различных медицинских и немедицинских заболеваниях; БЛУ – брыжеечный лимфатический узел, ВЗК – воспалительное заболевание кишечника

Состояние здоровья	Организм	Ткань	Штамм	Ссылка
Ожирение, связанное с «западной» диетой	Мышь	БЛУ	ATCC PTA 6475	[115]
Лечение раны	Мышь	Биопсия	ATCC PTA 6475	[116]
Системная красная волчанка	Мышь	Почки	ATCC PTA 6475	[117]
Некротический энтероколит	Мышь	Кишка, БЛУ	DSM 17938	[118]
Дикий тип	Мышь	БЛУ, селезёнка	100-23	[39]
Дикий тип	Мышь	Селезёнка	ATCC 23272	[119]
Дикий тип, ВЗК, atopический дерматит	Мышь	БЛУ, ободочная кишка, ухо	ATCC 23272	[120]
ВЗК	Человек	Периферическая кровь	RC-14	[121]

супернатант *L. reuteri* VM36301 может снижать продукцию TNF из клеток THP-1 миелоида человека [111]. Катаболиты триптофана *L. reuteri* являются лигандами для арилуглеводородного рецептора (AhR). Активируя AhR, *L. reuteri* могут стимулировать локальную продукцию IL-22 из врождённых лимфоидных клеток (ILC) [112]. Кроме того, производные триптофана, вырабатываемые *L. reuteri*, могут индуцировать развитие регуляторных CD₄⁺CD8αα⁺ двойных положительных интраэпителиальных лимфоцитов AhR-зависимым образом [113]. Учитывая, что AhR является широко экспрессируемым, *L. reuteri* и их метаболиты могут влиять на многие другие типы иммунных клеток, помимо ILC и Т-клеток [114].

РОЛЬ *L. REUTERI* В НЕЙРОМОДУЛЯЦИИ

Кишечная микробиота играет роль в функциях кишечной нервной системы (ENS) [122]. У субъектов с истощением микробиоты наблюдается аномальное состояние ENS [122, 123]. Лечение антибиотиками уменьшает количество нейронов в ENS. Это может быть связано с уменьшением нейротрофического фактора, происходящего из глиальной клеточной линии (GDNF), который может быть восстановлен стимуляцией TLR₂ [123]. Кроме того, у животных, не имеющих мик-

робов, наблюдается дефектная морфология и возбудимость ENS, которые можно обратить путем колонизации микробиоты [124]. *L. reuteri*, в частности, могут предотвращать реакцию висцеральной боли, главным образом, за счёт снижения активности кишечного нерва во время давления колоректального растяжения у мышей [125]. Живые, убитые нагреванием, гамма-облучённые *L. reuteri* или даже кондиционированная среда — всё это имело сходный эффект [125]. *L. reuteri* также могут продуцировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), основной ингибиторный нейротрансмиттер в центральной нервной системе [126]. Однако биологическая активность *in vivo* полученного ГАМК не была исследована [122]. Кроме того, *L. reuteri* могут увеличить возбудимость и число потенциалов действия в сенсорных нейронах толстой кишки крысы [127]. Эти различные эффекты *L. reuteri* могут быть связаны с различием в нейронах-мишенях [128].

РОЛЬ *L. REUTERI* В ЛЕЧЕНИИ ГИПЕРПРОНИЦАЕМОСТИ КИШЕЧНИКА

Физические, биохимические и иммунологические барьеры составляют барьерную функцию кишечника, которая необходима для блокирования проникновения внешних антигенов и токсинов [129]. Если в кишечном барьере возникают какие-либо нарушения, проницаемость может увеличиться, что приведёт к состоянию гиперпроницаемости кишечника. Различные пробиотики известны своей способностью усиливать барьерную функцию слизистой оболочки, примером которых являются *L. reuteri* [129]. При DSS-индуцированном колите введение *L. reuteri* может уменьшить бактериальную транслокацию из желудочно-кишечного тракта в брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) [130]. Кроме того, обработка склонных к волчанке мышей смесью видов *Lactobacillus*, включая *L. reuteri*, приводила к более высокой экспрессии белков с плотным соединением в эпителиальных клетках кишечника [117]. Впоследствии транслокация провоспалительных молекул, таких как липополисахариды, была значительно подавлена, что коррелировало с ослаблением заболевания. В дополнение к исследованиям на мышах было показано, что несколько штаммов *L. reuteri* обладают способностью модулировать экспрессию белка с плотным соединением и поддерживать целостность кишечного барьера у свиней [91]. Более того, способность *L. reuteri* снижать проницаемость кишечника наблюдалась у людей. У детей с атопическим дерматитом, у которых нарушалась барьерная функция кишечника положительно коррелировало с патогенезом заболевания [131], лечение *L. reuteri* DSM 12246 (и *L. rhamnosus* 19070-2) значительно снизило частоту симптомов забо-

леваний желудочно-кишечного тракта при уменьшении отношения лактулозы к манниту [132], что отражает улучшение состояния гиперпроницаемости кишечника [133].

V. БАКТЕРИИ РОДА *KLEBSIELLA*

Клебсиеллы были открыты более чем 100 лет назад немецким исследователем Е. Клебсом, который впервые обнаружил названные микроорганизмы, описал их патогенные свойства, но ему не удалось выделить бактерии в чистой культуре [134]. Хотелось бы отметить, что до настоящего времени нет ясности в вопросе о наименовании этих бактерий, так как начало открытия клебсиелл длительное время связывается с Фридлиндером [135], который выделил из экссудата пневмонического очага больного, умершего от пневмонии, типичные микроорганизмы и описал их свойства. Поэтому в литературе клебсиеллы встречаются под названием «палочки Фридлиндера» [136, 137].

В настоящее время клебсиеллы объединены в род *Klebsiella*, они относятся к этому роду по всем существующим классификациям энтеробактерий. В «Определителе бактерий Берджи» (1974) [138] представлено три вида: *K. pneumoniae*, *K. phinoschleromatis*, *K. oraenae*. К настоящему моменту род *Klebsiella* представлен двенадцатью видами [139]: *K. aerogenes*, *K. africana*, *K. granulomatis*, *K. grimontii*, *K. huaxiensis*, *K. michiganensis*, *K. oxytoca*, *K. pasteurii*, *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. spallanzanii*, *K. variicola*.

Клебсиеллы широко распространены в природе. Их обнаруживают в почве, пресной и морской воде, цветах, зёрнах, фруктах и овощах, промышленных стоках, древесине и т.д [140]. Заболевание у людей и животных этими бактериями регистрируются повсеместно. Представители данного рода считаются возбудителями заболеваний дыхательных путей, урогенитального тракта, мозговых оболочек, глаз, суставов и позвоночника, при различных гнойно-септических осложнениях, а также при острых желудочно-кишечных заболеваниях людей. Предложено рассматривать заболевания, вызываемые клебсиеллами, протекающие по типу острого сепсиса, как самостоятельную нозологическую единицу – клебсиеллёз [137, 141].

Клебсиеллы являются возбудителями заболеваний и у животных. Наиболее часто заболевания у них вызывают представители вида *K. pneumoniae*. Так, его подвид *K. pneumoniae*, как и *E. coli*, относящиеся к постоянной микрофлоре кишечника, может играть роль этиологического фактора при маститах, пневмониях, септицемиях коров,

свиней, лошадей, обезьян, инфекционной диареи молодняка животных. Эти патогенные бактерии были обнаружены при желудочно-кишечных заболеваниях телят [142–144].

МОРФОЛОГИЯ

Род *Klebsiella* объединяет неподвижные, имеющие капсулу, грамотрицательные, не образующие спор палочки неровно-овальной формы, длина и толщина которых колеблются от 0,6 до 6,0 мкм и от 0,3 до 1,5 мкм соответственно. Располагаются единично, парами, реже цепочками. Характерной особенностью клебсиелл является способность образовывать капсулу. Клебсиеллы были первыми капсульными микроорганизмами, описанными среди энтеробактерий. Капсульные варианты клебсиелл обычно выделяются из патологического материала людей и животных. Однако после культивирования на питательных средах некоторые штаммы теряют способность к капсулообразованию, другие, наоборот, сохраняют её годами. Бескапсульные варианты могут восстанавливать капсулу на углеродосодержащих средах. Для получения чистой капсульной популяции рекомендуется [145] применять методику селекции капсулы с пассированием через углеродосодержащие среды (глюкоза, сахароза), при контроле за чистотой популяции и степенью диссоциации в косо проходящем свете. Капсулу можно восстановить при пассировании клебсиелл через лабораторных животных [146]. Ширина капсулы может достигать от 0,3 до 1,27 мкм. длина – от 0,6 до 6 мкм [137]. При размножении клебсиелл капсула не делится, поэтому несколько клеток могут иметь общую капсулу. Для определения капсул существует множество методов окраски. Лучшие результаты для негативного окрашивания капсул дает простой способ окрашивания препаратов тушью.

Клебсиеллы – факультативные анаэробы. Все виды клебсиелл хорошо растут на простых питательных средах в широком диапазоне температур (от 4 до 43°C), оптимальная температура – 35–37°C, pH 7,2. Значимой особенностью клебсиелл считают обильный рост и образование на плотных питательных средах больших, выпуклых, часто сливающихся колоний слизистой консистенции. На агаре Эндо образуют часто красные и розовые слизистые колонии с металлическим блеском или без него, на агаре Плоскирева - красные, розовые или бесцветные колонии, на агаре Мак-Конки - красные или розовые, на ЭМС-агаре и среде Левина - тёмно-синие с металлическим блеском колонии [147].

Клебсиеллы способны образовывать гладкие и шероховатые формы колоний:

Таблица 3. Дифференцирующие признаки некоторых бактерий рода *Klebsiella* [147]

Тест или субстрат	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. terrigena</i>
			<i>ozaenae</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>rhinoscleromatis</i>	
Образование индола	+	±	-	-	-	-
Реакция с метиловым красным	+	+	+	± (чаще -)	+	±
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	-	+	-	+
Цитрат Симмонса	+	+	+	+	-	-
Гидролиз мочевины	+	+	-	+	-	-
Утилизация малоната	+	+	-	+	+	+
Ферментация дульцита (К)*	+	± (чаще -)	-	±	-	± (чаще -)
Ферментация лактозы (К)	+	+	±	+	-	+
Ферментация муката (К)	+	+	± (чаще -)	+	-	+
Ферментация лактозы (Г)**	-	-	+	+	+	-
Рост при 10°C	+	+	-	-	-	+

* – кислотообразование,

** – газообразование при 44°C.

– гладкие формы (МКО-мукоидные, капсульные с О-антигеном; КО-немукоидные, капсульные с О-антигеном; МО-мукоидные бескапсульные с О-антигеном; О-немукоидные, бескапсульные с О-антигеном);

– шероховатые формы (МКR-мукоидные, капсульные, без О-антигена; KR-немукоидные, капсульные, без О-антигена; MR-мукоидные, бескапсульные, без О-антигена; R-немукоидные, бескапсульные, без О-антигена).

В жидких средах рост капсульных вариантов сопровождается равномерным помутнением, слизистым осадком и плёнкой на поверхности бульона. Бескапсульные R-формы бактерий образуют гранулированный осадок с чистой и незамутненной надосадочной жидкостью. Бактерии могут расти на средах с цианистыми солями.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Клебсиеллы являются одними из наиболее ферментативноактивных представителей семейства энтеробактерий и утилизируют многие субстраты. Основным дифференциальным признаком является то, что клебсиеллы используют цитраты в качестве единственного источника углерода. Бактерии ферментируют большое число углеводов с выделением газов, в том числе лактозу, глюкозу, сахарозу, седонит, инозид, и гидролизуют мочевины. Протеолитическая активность клебсиелл выражена в слабой степени - сероводород не образуют, а также, в отличие от эшерихий, клебсиеллы не выделяют индол. Исключение составляет *K. oxytoca*, образующая индол. При этом они не разжижают желатин, вызывают газообразование в лактозо-желчно-солевом бульоне при температуре 44°C, а также используют гидроксиметилбензойную кислоту в качестве единственного источника углерода. Установлено специфическое свойство только для клебсиелл - цветная реакция с 5-аминосалициловой кислотой в питательной среде [148]. Данная реакция была положительна у всех исследованных авторами видов клебсиелл.

ПАТОГЕННОСТЬ

Эпизоотологические и эпидемиологические штаммы клебсиелл, особенно респираторного происхождения, высоко вирулентны для мышей, куриных эмбрионов. Факторы патогенности микроорганизмов разделены на три группы:

- определяющие взаимодействие возбудителя с эпителием, «воротами инфекции»;
- устойчивость микроорганизмов к гуморальным и клеточным факторам защиты макроорганизма;
- способность продуцировать токсины и токсические продукты.

Адгезивные свойства *K. pneumoniae* связаны с наличием у бактерий фимбриальных структур или ресничек [149, 150]. Наличие фимбрий часто коррелируется с гемагглютинирующей способностью бактерий. Разные штаммы клебсиелл могут синтезировать четыре различных типа гемагглютининов [150]. Фимбрии (реснички) представляют собой нитевидные выросты, исходящие из цитоплазмы и располагаю-

щиеся на поверхности клеток. На одной бактериальной клетке может быть расположено несколько сотен фимбрий [137]. Фактором патогенности, подавляющим гуморальные и клеточные факторы защиты хозяина, обнаруженные у клебсиелл, является полисахаридная капсула (по её антигенному составу обнаружено более 70 сероваров), которая защищает их от действия комплементсвязывающих веществ и фагоцитоза. У различных штаммов клебсиелл выявлены термолabile и термостабильные токсины:

– термо- и кислотостабильный токсин, который активирует систему «гуниталциклаза-цГМФ», по структуре и механизму действия аналогичен термостабильному энтеротоксину эшерихий;

– термолabile токсин, инактивируется при температуре 100–120°C, проявляет цитотоксическое действие и способствует проникновению возбудителя в кровотоки.

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Клебсиеллы, как и другие представители энтеробактерий, имеют капсульные К-соматические О- и R-антигены. Кроме того, как антигенный компонент у клебсиелл некоторые исследователи рассматривают слизистое образование клетки – М-антиген [151]. Наличие двух отличимых друг от друга капсульных антигенов впервые было продемонстрировано в 1915 году. Серологическую идентификацию клебсиелл проводят на основе определения в первую очередь К-антигенов. Это связано с тем, что свежeweделенные культуры обладают капсулой, которая полностью экранирует О-антиген бактерий. При получении бескапсульных форм для определения О-антигена часто образуются шероховатые варианты [152, 153]. В настоящее время у клебсиелл изучено более восьмидесяти К-антигенов. К-антигены по химическому составу представляют собой кислые полисахариды, построенные из отдельных сахаров и связанных между собой гексуроновых кислот, в основном глюкоуроновых, реже – галактоуроновых [146]. Антигенные свойства К-антигенов близки по термоустойчивости к О-антигенам, их агглютинабельность и агглютиногенность нарушается лишь при автоклавировании при температуре 120°C в течение 2,5 часов, а адсорбционная способность при 121°C за тот же период времени [137]. О-антигены представляют собой липополисахарида-протеиновый комплекс. Исследования О-антигенов клебсиелл сопряжены с рядом трудностей, связанных с большим количеством О-антигенов, по сравнению с К-антигенами, с термостабильностью капсулы, а также с большим количеством К-антигена при одном О-антигене.

УСТОЙЧИВОСТЬ ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

На обычных питательных средах клебсиеллы, несмотря на их известную устойчивость, склонны к диссоциации и довольно быстро могут погибнуть, но во внешней среде обладают высокой устойчивостью. Клебсиеллы обнаружены в почвах пустынь, в воде антарктического озера, в древесине лесных деревьев и стоках текстильного производства, в сахарном тростнике и т.д. Такое широкое повсеместное распространение клебсиелл называют экологической загадкой, и связано оно, по-видимому, с особыми биологическими свойствами микроорганизмов – наличием капсулы, которая, вероятно, обеспечивает их устойчивость ко многим факторам окружающей среды. При комнатной температуре клебсиеллы сохраняются неделями и месяцами. В пробах пыли, взятой при различной степени влажности, они сохраняются до 2,5 лет [154]. Сокращение периода выживания наблюдается при постоянной температуре (25°C) и повышенной влажности пыли (до 53–86%). Нагревание при 65°C вызывает гибель бактерий в течение одного часа. Об устойчивости клебсиелл к низким температурам свидетельствует тот факт, что их, как единственных представителей семейства энтеробактерий, удалось обнаружить в воде антарктического озера. Выделенные из воды и из организма больных диареей полярников штаммы клебсиелл могли расти при температуре от +4° до +45°C. При этом культуральные и ферментативные свойства у вышеупомянутых культур микроорганизмов проявлялись одинаково как при +37°, так и при +4°C. Эти особенности позволили считать клебсиеллы факультативными психрофильными бактериями. Клебсиеллы обладают повышенной устойчивостью в сравнении с эшерихиями к некоторым дезинфектантам, ультрафиолетовому облучению. Эти бактерии чувствительны к действию хлорамина, фенола, цитраля и других дезинфицирующих веществ. Как и другие патогенные энтеробактерии, штаммы клебсиелл, выделенные у больных или умерших животных, обладают полирезистентностью ко многим антибиотикам [142, 147]. Некоторые клинические штаммы клебсиелл устойчивы к пенициллину, левомоцитину, тетрациклину, эритромицину, карбециллину, имеют относительную чувствительность к некоторым гликозидным преапаратам: гентамицину, тромбамецину, сизомицину, амикацину, неомицину, мономицину, рифампицину (некоторые штаммы – к ампициллину) [137, 147]. Бактерии также имеют слабую чувствительность к полимиксину В, цефалотину, цефалоридину и канамицину. Устойчивость клебсиелл к антибиотикам связывают с R-плазмидой, потеря которой может происходить за небольшой срок пассирования в бульоне.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре фактически имеются две основные части, которые на первый взгляд плохо связаны между собой. Однако из названия можно понять, что два рассматриваемых рода – грамотрицательные *Klebsiella* и грамположительные *Lactobacillus* – на практике очень тесно контактируют в организме человека и оказывают на него совершенно противоположное действие. Первые очень опасны и вредны, причём борьба именно с клебсиеллами стала очень актуальной в самое последнее время, поскольку именно они в настоящее время представляют одну из самых опасных угроз для организма человека, особенно когда инфекция идет при развитии патогенов в форме биоплёнок. Судя по всему, эволюционный потенциал к антибиотикорезистентности именно у клебсиелл является одним из самых высоких среди грамотрицательных патогенов. Особенно уязвимыми к такому воздействию являются пациенты стационаров и хирургических отделений. Например, в трансплантологии, в среднем, каждая 25–30-я операция сопровождается сепсисом, вызванным патогенными бактериями. Наряду с хорошо известными стафилококками (до 40% все случаев инфекции) одним из родов таких опасных бактерий является род *Klebsiella*. Эти бактерии не только имеют множественную устойчивость к антибиотикам, но и могут переходить в состояние биоплёнок, в котором их устойчивость к любым воздействиям сильно возрастает. В настоящий момент существует несколько подходов для борьбы с патогенными организмами, в том числе с бактериями рода *Klebsiella*. Наиболее широкий подход – это применение комбинаций различных «классических» антимикробных препаратов для усиления антибактериального действия [155–159]. Однако данный подход имеет серьёзные негативные последствия и побочные эффекты для организма после терапии, что делает его не очень привлекательным. Достаточно новым и перспективным подходом для борьбы с клебсиеллами является использование бактериофагов [160–162]. Однако в данном подходе опасным может быть то, что бактериофаги не являются естественными обитателями микрофлоры человека, а значит, такая терапия может вызвать негативную реакцию иммунной системы. Лактобактерии до недавнего времени не рассматривались как потенциальный антипатогенный агент, лишь как пробиотики. При том, что о полезном влиянии лактобактерий на организм человека во время и после курса лечения антибиотиками, а также для профилактики и укрепления иммунитета известно давно, лишь в последнее время начало изучаться антипатогенное действие лактобактерий [26, 163, 164]. Одним из ключевых видов,

проявляющих активность против патогенов, является именно вид *L. reuteri*. Лактобактерии являются естественными обитателями здоровой микрофлоры человека, а значит, лишены доказанных и потенциальных негативных побочных эффектов антибиотиковой и фаговой терапий. Исследований на эту тему в мире практически нет, однако данное направление является очень перспективным для разработки новых антибактериальных препаратов на основе полезных представителей микрофлоры кишечника здорового человека, в том числе на основе бактерий *L. reuteri*. Поиск новых способов борьбы с патогенами, особенно имеющих малое количество негативных побочных эффектов, всё ещё является важной задачей для мирового научного сообщества, поэтому мы надеемся, что данный обзор, посвящённый особенностям двух родов бактерий, оказывающих противоположное действие на здоровье человека, сможет помочь исследователям установить причину антагонистического действия бактерий *L. reuteri* на клебсиеллы и использовать это для разработки антибактериальных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Islam S.U. (2016) Clinical uses of probiotics, *Medicine*, **95**, 5, 1–5.
2. Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D. (2013) Health benefits of probiotics: a review, *ISRN Nutrition*, 1–7.
3. Montalban-Arques A., De Schryver P., Bossier P., Gorkiewicz G., Mulero V., Gatlin D.M. (2015) Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates, *Frontiers in Immunology*, **6**, 512.
4. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B. (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **11**, 506–514.
5. Amara A.A., Shibl A. (2015) Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**, 107–114.
6. Shi L.H., Balakrishnan K., Thiagarajah K., Mohd Ismail N.I., Yin O.S. (2016) Beneficial properties of probiotics, *Tropical Life Sciences Research*, **27**, 73–90.
7. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. (2010) Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology, *Research in Microbiology*, **161**, 480–487.
8. Duar R.M., Lin X.B., Zheng J., Martino M.E., Grenier T., Perez-Munoz M.E. (2017) Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*, *FEMS Microbiology Reviews*, **41**, suppl. 1, s27–s48.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

9. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G. E., Gänzle M. G., Lebeer S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**, 4, 2782–2858.
10. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, 728–764.
11. Kandler O., Stetter K.O., Kohl R. (1980) *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli, *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I. Abt. Originale*, **1**, 264–269.
12. Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., Moller P.L., Michaelsen K.F., Paerregaard A. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4949–4956.
13. Valeur N., Engel P., Carbajal N., Connolly E., Ladefoged K. (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1176–1181.
14. Sinkiewicz, G. (2010) *Lactobacillus reuteri* in Health and Disease: Doctoral dissertation. Malmö: Malmö University, 66 p.
15. Jiang J., Li K., Xiao Y., Zhong A., Tang J., Duan Y., Li Z. (2023) *Limosilactobacillus reuteri* Regulating Intestinal Function: A Review, *Fermentation*, **9**, 1, 19.
16. Oh P.L., Benson A.K., Peterson D.A., Patil P.B., Moriyama E.N., Roos S. (2010) Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution, *The ISME Journal*, **4**, 377–387.
17. Walter J., Britton R.A., Roos S. (2011) Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, suppl. 1, 4645–4652.
18. Frese S.A., Mackenzie D.A., Peterson D.A., Schmaltz R., Fangman T., Zhou Y., Zhang C., Benson A.K., Cody L.A., Mulholland F., Juge N., Walter J. (2013) Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont, *PLoS Genetics*, **9**, 12, e1004057.
19. Mangalat N., Liu Y., Fatheree N.Y., Ferris M.J., Van Arsdall M.R., Chen Z., Rahbar M.H., Gleason W.A., Norori J., Tran D.Q., Rhoads J.M. (2012) Safety and tolerability of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and effects on biomarkers in healthy adults: results from a randomized masked trial, *PLoS One*, **7**, 9, e43910.
20. Hoy-Schulz Y.E., Jannat K., Roberts T., Zaidi S.H., Unicomb L., Luby S. (2016) Safety and acceptability of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* 35624 in Bangladeshi infants: a phase I randomized clinical trial, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**, 44.
21. McFall-Ngai M. (2007) Adaptive immunity: care for the community, *Nature*, 445, 153.
22. Indrio F., Riezzo G., Raimondi F., Bisceglia M., Cavallo L., Francavilla R. (2008) The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and

- gastrointestinal motility in preterm newborns, *The Journal of Pediatrics*, **152**, 801–806.
23. Hou C., Zeng X., Yang F., Liu H., Qiao S. (2015) Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **6**, 14.
 24. Wyres K.L., Nguyen T.N.T., Lam M.C.M., Judd L.M., van Vinh Chau N., Dance D.A.B., Ip M., Karkey A., Ling C.L., Miliya T., Newton P.N., Lan N.P.H., Sengduangphachanh A., Turner P. (2020) Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia, *Genome Medicine*, **12**, 11.
 25. Nirwati H., Sinanjung K., Fahrnunissa F., Wijaya F., Napitupulu S., Hati V.P., Hakim M.S., Meliala A., Aman A.T., Nuryastuti T. (2019) Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia, *BMC Proceedings*, **13**, suppl 11, 20.
 26. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V. (2021) Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and Multidrug Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 20, 10999.
 27. Seo B.J., Mun M.R., V J R.K., Kim C.J., Lee I., Chang Y.H. (2010) Bile tolerant *Lactobacillus reuteri* isolated from pig feces inhibits enteric bacterial pathogens and porcine rotavirus, *Veterinary Research Communications*, **34**, 323–333.
 28. Krumbeck J.A., Marsteller N.L., Freese S.A., Peterson D.A., Ramer-Tait A.E., Hutkins R.W. (2016) Characterization of the ecological role of genes mediating acid resistance in *Lactobacillus reuteri* during colonization of the gastrointestinal tract, *Environmental Microbiology*, **18**, 2172–2184.
 29. Salas-Jara M.J., Ilabaca A., Vega M., Garcia A. (2016) Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics, *Microorganisms*, **4**, E35.
 30. Roos S., Jonsson H. (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components, *Microbiology*, **148**(pt. 2), 433–442.
 31. Gunning A.P., Kavanaugh D., Thursday E., Etzold S., MacKenzie D.A., Juge N. (2016) Use of atomic force microscopy to study the multi-molecular interaction of bacterial adhesins to mucins, *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, E1854.
 32. Mackenzie D.A., Jeffers F., Parker M.L., Vibert-Vallet A., Bongaerts R.J., Roos S. (2010) Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*, *Microbiology*, **156**(pt. 11), 3368–3378.
 33. Wang B., Wei H., Yuan J., Li Q., Li Y., Li N. (2008) Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells, *Current Microbiology*, **57**, 33–38.
 34. Jensen H., Roos S., Jonsson H., Rud I., Grimmer S., van Pijkeren J.P. (2014) Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro, *Microbiology*, **160**(pt. 4), 671–681.
 35. Walter J., Schwab C., Loach D.M., Ganzle M.G., Tannock G.W. (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse

- gastrointestinal tract, *Microbiology*, **154**(pt. 1), 72–80.
36. Walter J., Loach D.M., Alqumber M., Rockel C., Hermann C., Pfitzenmaier M. (2007) D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract, *Environmental Microbiology*, **9**, 1750–1760.
 37. Frese S.A., Benson A.K., Tannock G.W., Loach D.M., Kim J., Zhang M. (2011) The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*, *PLoS Genetics*, **7**, e1001314.
 38. Su M.S., Ganzle M.G. (2014) Novel two-component regulatory systems play a role in biofilm formation of *Lactobacillus reuteri* rodent isolate 100-23, *Microbiology*, **160**(pt. 4), 795–806.
 39. Sims I.M., Frese S.A., Walter J., Loach D., Wilson M., Appleyard K. (2011) Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23, *The ISME Journal*, **5**, 1115–1124.
 40. McMillan A., Dell M., Zellar M.P., Cribby S., Martz S., Hong E. (2011) Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**, 58–64.
 41. Olson J.K., Rager T.M., Navarro J.B., Mashburn-Warren L., Goodman S.D., Besner G.E. (2016) Harvesting the benefits of biofilms: a novel probiotic delivery system for the prevention of necrotizing enterocolitis, *Journal of Pediatric Surgery*, **51**, 936–941.
 42. Navarro J.B., Mashburn-Warren L., Bakaletz L.O., Bailey M.T., Goodman S.D. (2017) Enhanced probiotic potential of *Lactobacillus reuteri* when delivered as a biofilm on dextranomer microspheres that contain beneficial cargo, *Frontiers in Microbiology*, **8**, 489.
 43. Talarico T.L., Casas I.A., Chung T.C., Dobrogosz W.J. (1988) Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **32**, 1854–1858.
 44. Mishra S.K., Malik R.K., Manju G., Pandey N., Singroha G., Behare P. (2012) Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* BPL-36 strain isolated from human infant fecal sample, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **4**, 154–161.
 45. Greifova G., Majekova H., Greif G., Body P., Greifova M., Dubnickova M. (2017) Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*, *Folia Microbiologica*, **62**, 515–524.
 46. Talarico T.L., Dobrogosz W.J. (1989) Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33**, 674–679.
 47. Talarico T.L., Dobrogosz W.J. (1990) Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1195–1197.
 48. Chen G., Chen J. (2013) A novel cell modification method used in bio-transformation of glycerol to 3-HPA by *Lactobacillus reuteri*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 4325–4332.
 49. Yang G., Tian J., Li J. (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 1017–1024.
 50. Stevens M.J., Vollenweider S., Meile L., Lacroix C. (2011) 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production, *Microbial Cell Factories*, **10**, 61.

51. Engels C., Schwab C., Zhang J., Stevens M.J., Bieri C., Ebert M.O. (2016) Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin, *Scientific Reports*, **6**, 36246.
52. Cleusix V., Lacroix C., Vollenweider S., Duboux M., Le Blay G. (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria, *BMC Microbiology*, **7**, 101.
53. Abhisingha M., Dumnil J., Pitaksutheepong C. (2017) Selection of potential probiotic *Lactobacillus* with inhibitory activity against *Salmonella* and fecal coliform bacteria, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **10**, 2, 218–227.
54. Genis S., Sanchez-Chardi A., Bach A., Fabregas F., Aris A. (2017) A combination of lactic acid bacteria regulates *Escherichia coli* infection and inflammation of the bovine endometrium, *Journal of Dairy Science*, **100**, 479–492.
55. Lesbros-Pantofflickova D., Cortesy-Theulaz I., Blum A.L. (2007) *Helicobacter pylori* and probiotics, *The Journal of Nutrition*, **137**, 3, Suppl. 2, 812S–818S.
56. Park S.K., Park D.I., Choi J.S., Kang M.S., Park J.H., Kim H.J. (2007) The effect of probiotics on *Helicobacter pylori* eradication, *Hepato-gastroenterology*, **54**, 2032–2036.
57. Mukai T., Asasaka T., Sato E., Mori K., Matsumoto M., Ohori H. (2002) Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **32**, 105–110.
58. Francavilla R., Lionetti E., Castellaneta S.P., Magista A.M., Maurogiovanni G., Bucci N. (2008) Inhibition of *Helicobacter pylori* infection in humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and effect on eradication therapy: a pilot study, *Helicobacter*, **13**, 127–134.
59. Ojetti V., Bruno G., Ainora M.E., Gigante G., Rizzo G., Roccarina D. (2012) Impact of *Lactobacillus reuteri* supplementation on anti-*Helicobacter pylori* levofloxacin-based second-line therapy, *Gastroenterology Research and Practice*, **2012**, 740381.
60. Francavilla R., Polimeno L., Demichina A., Maurogiovanni G., Principi B., Scaccianoce G. (2014) *Lactobacillus reuteri* strain combination in *Helicobacter pylori* infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Journal of Clinical Gastroenterology*, **48**, 407–413.
61. Holz C., Busjahn A., Mehling H., Arya S., Boettner M., Habibi H., Lang C. (2015) Significant Reduction in *Helicobacter pylori* Load in Humans with Non-viable *Lactobacillus reuteri* DSM17648: A Pilot Study, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **7**, 91–100.
62. Dore M.P., Soro S., Rocchi C., Loria M.F., Bibbò S., Pes G.M. (2016) Inclusion of *Lactobacillus Reuteri* in the Treatment of *Helicobacter pylori* in Sardinian Patients, *Medicine (Baltimore)*, **95**, 15, e3411.
63. Dore M.P., Cuccu M., Pes G.M., Manca A., Graham D.Y. (2014) *Lactobacillus reuteri* in the treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Internal and Emergency Medicine*, **9**, 649–654.
64. Lionetti E., Miniello V.L., Castellaneta S.P. (2006) *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-*Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **24**, 10, 1461–1468.
65. Scaccianoce G., Zullo A., Hassan C., Gentili F., Cristofari F., Cardinale V., Gigliotti F., Piglionica D., Morini S. (2008) Triple therapies plus different

- probiotics for *Helicobacter pylori* eradication, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **12**, 251–256.
66. Imase K., Tanaka A., Tokunaga K., Sugano H., Ishida H., Takahashi S. (2007) *Lactobacillus reuteri* Tablets Suppress *Helicobacter pylori* Infection – A Double-blind Randomised Placebo-controlled Cross-over Clinical Study, *Kansenshogaku Zasshi*, **81**, 387–393.
67. Mehling H., Busjahn A. (2013) Non-Viable *Lactobacillus reuteri* DSMZ 17648 (Pylopass™) as a New Approach to *Helicobacter pylori* Control in Humans, *Nutrients*, **5**, 8, 3062–3073.
68. Brenner T.A., Rice T.A., Anderson E.D., Percopo C.M., Rosenberg H.F. (2016) Immortalized MH-S cells lack defining features of primary alveolar macrophages and do not support mouse pneumovirus replication, *Immunology Letters*, **172**, 106–112.
69. Piyathilake C.J., Ollberding N.J., Kumar R., Macaluso M., Alvarez R.D., Morrow C.D. (2016) Cervical microbiota associated with higher grade cervical intraepithelial neoplasia in women infected with high-risk human papillomaviruses, *Cancer Prevention Research*, **9**, 357–366.
70. Karaffova V., Csank T., Mudronova D., Kiraly J., Revajova V., Gancarcikova S. (2017) Influence of *Lactobacillus reuteri* L26 Biocenol on immune response against porcine circovirus type 2 infection in germ-free mice, *Beneficial Microbes*, **8**, 367–378.
71. Ang L.Y., Too H.K., Tan E.L., Chow T.K., Shek P.C., Tham E. (2016) Antiviral activity of *Lactobacillus reuteri* Protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines, *Virology Journal*, **13**, 111.
72. Jorgensen M.R., Kragelund C., Jensen P.O., Keller M.K., Twetman S. (2017) Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro, *Journal of Oral Microbiology*, **9**, 1274582.
73. Thomas C.M., Hong T., van Pijkeren J.P., Hemarajata P., Trinh D.V., Hu W. (2012) Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling, *PLoS One*, **7**, e31951.
74. Gao C., Major A., Rendon D., Lugo M., Jackson V., Shi Z. (2015) Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*, *mBio*, **6**, e01358-15.
75. Thomas C.M., Saulnier D.M., Spinler J.K., Hemarajata P., Gao C., Jones S.E. (2016) FolC2-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*, *MicrobiologyOpen*, **5**, 802–818.
76. Hemarajata P., Gao C., Pflughoeft K.J., Thomas C.M., Saulnier D.M., Spinler J.K. (2013) *Lactobacillus reuteri*-specific immunoregulatory gene rsiR modulates histamine production and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri*, *Journal of Bacteriology*, **195**, 5567–5576.
77. Linares D.M., Gomez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Ross R.P. (2017) Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods, *Frontiers in Microbiology*, **8**, 846.
78. Gu Q., Zhang C., Song D., Li P., Zhu X. (2015) Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*, *International Journal of Food Microbiology*, **206**, 56–59.
79. Morita H., Toh H., Fukuda S., Horikawa H., Oshima K., Suzuki T. (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a geno-

- mic island for reuterin and cobalamin production, *DNA Research*, **15**, 151–161.
80. Molina V.C., Medici M., Taranto M.P., Font de Valdez G. (2009) *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B deficiency, *Journal of Applied Microbiology*, **106**, 467–473.
81. Ksonzekova P., Bystricky P., Vlckova S., Patoprsty V., Pulzova L., Mudronova D. (2016) Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response, *Carbohydrate Polymers*, **141**, 10–19.
82. Chen X.Y., Woodward A., Zijlstra R.T., Ganzle M.G. (2014) Exopolysaccharides synthesized by *Lactobacillus reuteri* protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets, *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 5752–5760.
83. Wang Y., Ganzle M.G., Schwab C. (2010) Exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 4863–4866.
84. Bene K., Varga Z., Petrov V.O., Boyko N., Rajnavolgyi E. (2017) Gut microbiota species can provoke both inflammatory and tolerogenic immune responses in human dendritic cells mediated by retinoic acid receptor alpha ligation, *Frontiers in Immunology*, **8**, 427.
85. Mu Q., Zhang H., Luo X.M. (2015) SLE: another autoimmune disorder influenced by microbes and diet?, *Frontiers in Immunology*, **6**, 608.
86. Scott K.P., Antoine J.M., Midtvedt T., van Hemert S. (2015) Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease, *Microbial Ecology in Health and Disease*, **26**, 25877.
87. Su Y., Chen X., Liu M., Guo X. (2017) Effect of three lactobacilli with strain-specific activities on the growth performance, faecal microbiota and ileum mucosa proteomics of piglets, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **8**, 52.
88. Garcia Rodenas C.L., Lepage M., Ngom-Bru C., Fotiou A., Papagarioufalas K., Berger B. (2016) Effect of formula containing *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 on fecal microbiota of infants born by cesarean-section, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **63**, 681–687.
89. He B., Hoang T.K., Wang T., Ferris M., Taylor C.M., Tian X. (2017) Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits Treg deficiency-induced autoimmunity via adenosine A2A receptors, *Journal of Experimental Medicine*, **214**, 107–123.
90. Britton R.A., Irwin R., Quach D., Schaefer L., Zhang J., Lee T. (2014) Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model, *Journal of Cellular Physiology*, **229**, 1822–1830.
91. Wang Z., Wang L., Chen Z., Ma X., Yang X., Zhang J. (2016) In vitro evaluation of swine-derived *Lactobacillus reuteri*: probiotic properties and effects on intestinal porcine epithelial cells challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **26**, 1018–1025.
92. Savino F., Fornasero S., Ceratto S., De Marco A., Mandras N., Roana J. (2015) Probiotics and gut health in infants: a preliminary case-control observational study about early treatment with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Clinica Chimica Acta*, **451**(pt. 1), 82–87.
93. Martoni C.J., Labbe A., Ganopolsky J.G., Prakash S., Jones M.L. (2015) Changes in bile acids, FGF-19 and

- sterol absorption in response to bile salt hydrolase active *L. reuteri* NCIMB 30242, *Gut Microbes*, **6**, 57–65.
94. Jones M.L., Martoni C.J., Prakash S. (2012) Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial, *European Journal of Clinical Nutrition*, **66**, 1234–1241.
95. Mobini R., Tremaroli V., Stahlman M., Karlsson F., Levin M., Ljungberg M. (2017) Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **19**, 579–589.
96. del Campo R., Garriga M., Perez-Aragon A., Guallarte P., Lamas A., Maiz L. (2014) Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: a double blind prospective study, *Journal of Cystic Fibrosis*, **13**, 716–722.
97. Zhang D., Ji H., Liu H., Wang S., Wang J., Wang Y. (2016) Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 10081–10093.
98. Liu H., Hou C., Wang G., Jia H., Yu H., Zeng X. (2017) *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates intestinal host defense peptide expression in the model of IPEC-J2 cells and neonatal piglets, *Nutrients*, **9**, E559.
99. Yang Y., Zhao X., Le M.H., Zijlstra R.T., Ganzle M.G. (2015) Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs, *Frontiers in Microbiology*, **6**, 762.
100. Romani Vestman N., Chen T., Lif Holgerson P., Ohman C., Johansson I. (2015) Oral microbiota shift after 12-week supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; a randomized control trial, *PLoS One*, **10**, e0125812.
101. Iniesta M., Herrera D., Montero E., Zurbriggen M., Matos A.R., Marin M.J. (2012) Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial, *Journal of Clinical Periodontology*, **39**, 736–744.
102. Macklaim J.M., Clemente J.C., Knight R., Gloor G.B., Reid G. (2015) Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy, *Microbial Ecology in Health and Disease*, **26**, 27799.
103. Petricevic L., Unger F.M., Viernstein H., Kiss H. (2008) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **141**, 54–57.
104. Bisanz J.E., Seney S., McMillan A., Vongsa R., Koenig D., Wong L. (2014) A systems biology approach investigating the effect of probiotics on the vaginal microbiome and host responses in a double blind, placebo-controlled clinical trial of post-menopausal women, *PLoS One*, **9**, e104511.
105. Gille C., Boer B., Marschal M., Urschitz M.S., Heinecke V., Hund V. (2016) Effect of probiotics on vaginal health in pregnancy. EFFPRO, a randomized controlled trial, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, **215**, 608.e1–608.e7.

106. Wang P., Li Y., Xiao H., Shi Y., Le G.W., Sun J. (2016) Isolation of *Lactobacillus reuteri* from Peyer's patches and their effects on sIgA production and gut microbiota diversity, *Molecular Nutrition & Food Research*, **60**, 2020–2030.
107. Bottcher M.F., Abrahamsson T.R., Fredriksson M., Jakobsson T., Bjorksten B. (2008) Low breast milk TGF-beta2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy, *Pediatric Allergy and Immunology*, **19**, 497–504.
108. Ericson D., Hamberg K., Bratthall G., Sinkiewicz-Enggren G., Ljunggren L. (2013) Salivary IgA response to probiotic bacteria and mutans streptococci after the use of chewing gum containing *Lactobacillus reuteri*, *Pathogens and Disease*, **68**, 82–87.
109. Braathen G., Ingildsen V., Twetman S., Ericson D., Jorgensen M.R. (2017) Presence of *Lactobacillus reuteri* in saliva coincide with higher salivary IgA in young adults after intake of probiotic lozenges, *Beneficial Microbes*, **8**, 17–22.
110. Hsieh F.C., Lan C.C., Huang T.Y., Chen K.W., Chai C.Y., Chen W.T. (2016) Heat-killed and live *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 exhibit similar effects on improving metabolic functions in high-fat diet-induced obese rats, *Food & Function*, **7**, 2374–2388.
111. Lee J., Yang W., Hostetler A., Schultz N., Suckow M.A., Stewart K.L. (2016) Characterization of the anti-inflammatory *Lactobacillus reuteri* BM36301 and its probiotic benefits on aged mice, *BMC Microbiology*, **16**, 69.
112. Zelante T., Iannitti R.G., Cunha C., De Luca A., Pieraccini G.G. (2013) Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22, *Immunity*, **39**, 372–385.
113. Cervantes-Barragan L., Chai J.N., Tianero M.D., Di Luccia B., Ahern P.P., Merriman J. (2017) *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+CD8alphaalpha+T cells, *Science*, **357**, 806–810.
114. Nguyen N.T., Hanieh H., Nakahama T., Kishimoto T. (2013) The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses, *International Immunology*, **25**, 335–343.
115. Poutahidis T., Kleinewietfeld M., Smillie C., Levkovich T., Perrotta A., Bhela S. (2013) Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity, *PLoS One*, **8**, e68596.
116. Poutahidis T., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R. (2013) Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin, *PLoS One*, **8**, e78898.
117. Mu Q., Zhang H., Liao X., Lin K., Liu H., Edwards M.R. (2017) Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota, *Microbiome*, **5**, 73.
118. Liu Y., Tran D.Q., Fatheree N.Y., Rhoads J.M. (2014) *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 differentially modulates effector memory T cells and Foxp3+ regulatory T cells in a mouse model of necrotizing enterocolitis, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **307**, G177–G186.
119. Karimi K., Inman M.D., Bienenstock J., Forsythe P. (2009) *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice, *American*

- Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **179**, 186–193.
120. Abediankenari S., Ghasemi M. (2009) Generation of immune inhibitory dendritic cells and CD4+T regulatory cells inducing by TGF-beta, *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, **8**, 25–30.
 121. Lorea Baroja M., Kirjavainen P.V., Hekmat S., Reid G. (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients, *Clinical & Experimental Immunology*, **149**, 470–479.
 122. Yoo B.B., Mazmanian S.K. (2017) The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut, *Immunity*, **46**, 910–926.
 123. Brun P., Giron M.C., Qesari M., Porzionato A., Caputi V., Zoppellaro C. (2013) Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system, *Gastroenterology*, **145**, 1323–1333.
 124. Collins J., Borojevic R., Verdu E.F., Huizinga J.D., Ratcliffe E.M. (2014) Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system, *Neurogastroenterology & Motility*, **26**, 98–107.
 125. Kamiya T., Wang L., Forsythe P., Goettsche G., Mao Y., Wang Y. (2006) Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats, *Gut*, **55**, 191–196.
 126. Pallin A., Agback P., Jonsson H., Roos S. (2016) Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*, *Food Microbiology*, **57**, 159–171.
 127. Kunze W.A., Mao Y.K., Wang B., Huizinga J.D., Ma X., Forsythe P. (2009) *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13**, 2261–2270.
 128. Lai N.Y., Mills K., Chiu I.M. (2017) Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence, *Journal of Internal Medicine*, **282**, 5–23.
 129. Mu Q., Kirby J., Reilly C.M., Luo X.M. (2017) Leaky gut as a danger signal for autoimmune diseases, *Frontiers in Immunology*, **8**, 598.
 130. Dicksved J., Schreiber O., Willing B., Petersson J., Rang S., Phillipson M. (2012) *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction, *PLoS One*, **7**, e46399.
 131. De Benedetto A., Rafaels N.M., McGirt L.Y., Ivanov A.I., Georas S.N., Cheadle C. (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **127**, 771.e7-786.e7.
 132. Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N.H., Paerregaard A., Michaelsen K.F. (2004) Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis, *The Journal of Pediatrics*, **145**, 612–616.
 133. Camilleri M., Nadeau A., Lamsam J., Nord S.L., Ryks M., Burton D. (2010) Understanding measurements of intestinal permeability in healthy humans with urine lactulose and mannitol excretion, *Neurogastroenterology & Motility*, **22**, e15–e26.

134. Klebs E. (1875) Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Schizomyceten. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **3**, 305–324.
135. Friedlaender C. (1882) Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, **87**, 319–324.
136. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. (1995) Определитель зоопатогенных микроорганизмов: Справочник. Москва: Колос, 319 с.
137. Красноголовец В.Н., Киселёва Б.С. (1996) Клебсиеллёзные инфекции. Москва: Медицина, 256 с.
138. Bergey D.H., Buchanan R.E., Gibbons N.E. (1974) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1094 p.
139. <https://www.bacterio.net/genus/klebsiella>. LPSN: Genus *Klebsiella*. [Online].
140. Bagley S.T. (1985) Habitat association of *Klebsiella* species, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **6**, 52–58.
141. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселёва Б.С. (1985) Энтеробактерии: руководство для врачей. Москва: Медицина, 320 с.
142. Дегтярёв В.П., Федотов С.В., Удалов Г.М. (2016) Этиопатогенез и профилактика острых желудочно-кишечных заболеваний новорождённых телят, *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*, **145**, 11, 123–129.
143. Каврук, Л. (1994) Тесты, критерии и методы ускоренной санитарно-бактериологической оценки репродукторных помещений животноводческих ферм и пути оптимизации в них микробиоценоза: Дисс. докт. вет. наук. Москва: ВНИИ вет. санитарии, гигиены и экологии, 43 с.
144. Нафеев А.А., Салина Г.В., Кутинова С.В., Жукова Е.Ю., Пелевина Н.И. (2017) Зоонозные инфекции, с природной очаговостью, с позиции эпидемиологического и эпизоотологического диагнозов, *Инфекция и иммунитет*, **9**, 470.
145. Киселёва Б.С., Красноголовец В.Н. (1982) Клинические особенности клебсиеллёзной инфекции. *Клиническая медицина*, **2**, 88–90.
146. Blobel H., Schliesser T. (1994) *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Deutsch: Urban & Fischer in Elsevier, 293 p.
147. Бульканова Е.А., Золотухин С.Н., Митрохина Е.Н. (2004) Биологические свойства бактерий рода *Klebsiella* и их значение в патологии животных, *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*, **12**, 34–40.
148. Сиволодский Е.Л., Ровнов Н.В., Петров Л.Н. (1994) Механизм специфической хромогенной реакции *K. Spp.* на питательной среде с 5-аминосалициловой кислотой, *Микробиология*, **3**, 489–494.
149. Constable F. (1956) Fimbriae and haemagglutinating activity in strains of *Bacterium cloacae*, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **72**, 1, 133–136.
150. Duguid J.P., Gillies R.R. (1958) Fimbriae and haemagglutinating activity in *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* and *Chromobacterium*, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **75**, 519–520.

151. Edwards P.R., Fife M.A. (1955) Studies on the *Klebsiella-aerobacter* group of bacteria, *Journal of Bacteriology*, **70**, 4, 382–390.
152. Kauffmann F. (1966) The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. Williams & Wilkins, 400 p.
153. Edwards P.R., Ewing W.H. (1986) Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, 536 p.
154. Gundermann K. (1972) Life-span of bacterial strains in dust as influenced by various degrees of air humidity, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe B: Hygiene, präventive Medizin*, **156**, 4, 422–429.
155. Agyeman A.A., Bergen P.J., Rao G.G., Nation R.L., Landersdorfer C.B. (2020) A systematic review and meta-analysis of treatment outcomes following antibiotic therapy among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **55**, 1, 105833.
156. Hirsch E.B., Tam V.H. (2010) Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**, 6, 1119–1125.
157. Petrosillo N., Giannella M., Lewis R., Viale P. (2013) Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **11**, 2, 159–177.
158. Lee G.C., Burgess D.S. (2012) Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **11**, 32.
159. Qureshi Z.A., Paterson D.L., Potoski B.A., Kilayko M.C., Sandovsky G., Sordillo E., Polsky B., Adams-Haduch J.M., Doi Y. (2012) Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**, 4, 2108–2113.
160. Hesse S., Malachowa N., Porter A.R., Freedman B., Kobayashi S.D., Gardner D.J., Scott D.P., Adhya S., DeLeo F.R. (2021) Bacteriophage Treatment Rescues Mice Infected with Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258, *mBio*, **12**, 1, e00034-21.
161. Eskenazi A., Lood C., Wubbolts J., Hites M., Balarjishvili N., Leshkasheli L., Askilashvili L., Kvachadze L., van Noort V., Wagemans J., Jayankura M., Chanishvili N., de Boer M., Nibbering P., Kutateladze M., Lavigne R., Merabishvili M., Pirnay J.P. (2022) Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Nature Communications*, **13**, 1, 302.
162. Anand T., Virmani N., Kumar S., Mohanty A.K., Pavulraj S., Bera B.C., Vaid R.K., Ahlawat U., Tripathi B.N. (2020) Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **21**, 34–41.
163. Chandla S., Harjai K., Shukla G. (2021) Synergistic Effect of Bio-genics Derived from Potential Probiotics Together with Zingerone Against Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **13**, 5, 1481–1497.

164. Chandla S., Harjai K., Shukla G. (2022) Combinatorial Therapeutic Strategy of Biogenics Derived from *Lactobacillus fermentum* PUM and Zingerone Against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-Induced Surgical Site Infection: an Experimental Study, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **14**, 4, 712–726.