ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VITRO*

Петров С.А.[1], Калёнова Л.Ф.[1], Суховей Ю.Г.[1], Костоломова Е.Г.[2], Бажин А.С.[1], Нарушко М.В.[1]

[1] ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Резюме. Изучено влияние метаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS из многолетнемерзлых пород плейстоцен-голоценового периода на механизмы и направленность формирования иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro*. Установлено, что экзометаболиты палеобактерий значимо активируют дифференцировку моноцитов в субпопуляции промежуточных ($CD14^+CD16^+$) и неклассических ($CD14^{lo}CD16^+$) моноцитов, эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов со сменой маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, дифференцировку Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$), а также стимулируют синтез цитокинов IFNγ и IL-4 относительно контрольных уровней. К особенностям влияния экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа их получения – «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5 °C), «среднетемпературные» (22 °C) и «тепловые» (37 °C) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно – дифференцировку промежуточных $CD14^+CD16^+$ моноцитов, увеличение активности дифференцировки $CD8^+$Т-лимфоцитов и синтеза IFNγ. «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно дифференцировку неклассических $CD14^{lo}CD16^+$ моноцитов, увеличение активности дифференцировки $CD4^+$Т-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые 3 суток культивирования клеток активность дифференцировки $CD8^+$Т-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой $CD4^+$Т-лимфоцитов, а уровень секреции IFNγ превышает уровень IL-4. На 3-и сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к норма-

Адрес для переписки:
Петров Сергей Анатольевич
ФГБУН «Тюменский научный центр»
Сибирского отделения Российской академии наук
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Малыгина, 86.
Тел.: 8 (969) 804-50-00.
E-mail: tumiki@yandex.ru

Address for correspondence:
Sergey A. Petrov
Tyumen Scientific Center, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences
86 Malygin St
Tyumen
625026 Russian Federation
Phone: +7 (969) 804-50-00.
E-mail: tumiki@yandex.ru

Образец цитирования:
С.А. Петров, Л.Ф. Калёнова, Ю.Г. Суховей, Е.Г. Костоломова, А.С. Бажин, М.В. Нарушко «Влияние экзометаболитов палеобактерий рода Bacillus из многолетнемерзлых пород на механизмы формирования иммунного ответа in vitro» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 6. С. 1259-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

© Петров С.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
S.A. Petrov, L.F. Kalyonova, Yu.G. Sukhovey, E.G. Kostolomova, A.S. Bazhin, M.V. Narushko "In vitro effects of paleobacteria exometabolites from permafrost soils on development of immune response", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1259-1270.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

© Petrov S.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-3023

лизации баланса между IFNγ(Th1) и IL-4(Th2) к 7-м суткам. Прослеживается четкое влияние Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что, с одной стороны, препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой – не приводит к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3-и сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина IFNγ. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

Ключевые слова: палеобактерии, метаболиты, моноциты, Т-лимфоциты, субпопуляции, Treg, IFNγ, IL-4, Bacillus cereus

IN VITRO EFFECTS OF PALEOBACTERIA EXOMETABOLITES FROM PERMAFROST SOILS ON DEVELOPMENT OF IMMUNE RESPONSE

Petrov S.A.[a], Kalyonova L.F.[a], Sukhovey Yu.G.[a], Kostolomova E.G.[b], Bazhin A.S.[a], Narushko M.V.[a]

[a] *Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*
[b] *Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation*

Abstract. We have tested the effects of metabolites from paleobacteria *Bacillus cereus*, strain 875 TS, from Pleistocene-Holocene permafrost rocks aiming to assess the mechanisms and features of *in vitro* immune response in the culture of human peripheral blood mononuclear cells. It was found that paleobacterial exometabolites significantly activate monocyte differentiation into subpopulations of intermediate ($CD14^+CD16^+$) and non-classical ($CD14^{lo}CD16^+$) monocytes, effector $CD4^+$ and $CD8^+$T lymphocytes, with changes of early (CD69), intermediate (CD25) and late (HLA-DR) activation markers, Treg differentiation ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127$-). These metabolites also stimulated the synthesis of IFNγ and IL-4 cytokines as compared with control levels. The differential influence of paleobacterial exometabolites upon immunomodulatory activity depended on temperature regimen of their production, i.e., "cold" (obtained from bacteria during their cultivation at 5 °C), "medium-temperature" (22 °C) and "heat" (37 °C) regimens. "Cold" metabolites stimulate predominantly the immune response mechanisms with proinflammatory activity, i.e., differentiation of intermediate $CD14^+CD16^+$ monocytes, increased differentiation activity of $CD8^+$T lymphocytes, and synthesis of IFNγ. "Warm" metabolites stimulate mostly the immune response mechanisms with anti-inflammatory activity, namely, differentiation of non-classical $CD14^{lo}CD16^+$ monocytes, increased differentiation activity of $CD4^+$ T lymphocytes and secretion of IL-4. Another distinctive feature is the ratio of pro- and anti-inflammatory mechanisms, which does not depend on the type of exometabolites. Thus, during the first three days of cell cultivation, the differentiation activity of $CD8^+$T lymphocytes prevails over the differentiation of $CD4^+$T lymphocytes, and the level of IFNγ secretion exceeds the IL-4 amounts. On the third day, there is a significant increase in the Treg level, which is accompanied by a tendency to normalize the balance between IFNγ (Th1) and IL-4 (Th2) by the seventh day. We have observed a clear effect of Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) on the strength and duration of the immune response. The increase in Treg levels occurs moderately and transiently, which, on the one hand, prevents the excessive development of proinflammatory mechanisms, and on the other hand, does not lead to the development of long-term immune suppression. An increase in the Treg level on days 1-3 is accompanied by a decreased activity of monocyte differentiation into the subsets and the synthesis of proinflammatory IFNγ cytokine. Considering that one of the main functions of induced Treg is the suppression of systemic inflammatory, autoimmune and allergic diseases, increase in their activity under the influence of exometabolites of paleobacteria *Bacillus cereus* strain 875 TS may serve as a basis for the development of new biopreparations for treatment of a wide range of diseases.

Keywords: paleobacteria, metabolites, monocytes, T lymphocytes, subpopulations, Treg, IFNγ, IL-4, Bacillus cereus

Исследования выполнялись в рамках Государственного задания на 2021-2030 годы: «Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах и суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата» (приоритетное направление 1.5.11, программа 1.5.11.1).

Введение

Одной из важных задач медицины попрежнему остается поиск способов и методов коррекции нарушений иммунного статуса. Современный уровень знаний тонких механизмов развития иммунного ответа позволяет с высокой степенью репрезентативности подойти к выбору и оценке эффективности разрабатываемых иммунотропных препаратов методами *in vitro*.

Известно, что направленность иммунного ответа определяется превалированием активности той или иной субпопуляции моноцитов и Т-лимфоцитов, активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), балансе про- и противовоспалительных цитокинов.

Популяция моноцитов, циркулирующих в периферической крови, состоит из трех фенотипически и функционально различных субпопуляций, которые различаются по экспрессии поверхностного CD14 (клеточный корецептор липополисахарида) и CD16 (низкоаффинный рецептор IgG) [12, 16, 29]. Например, классические моноциты ($CD14^{hi}CD16^{-}$) участвуют в тканевом гомеостазе, фагоцитозе, первыми мигрируют в очаг воспаления, инициируют противогрибковый ответ, продуцируют IL-6, IL-10, G-CSF и др. [17, 26, 29, 30]. Промежуточные моноциты ($CD14^{hi}CD16^{+}$) отвечают в том числе за пролиферацию и стимуляцию Т-лимфоцитов, процессинг MHC класса II, антигенпрезентацию, активируют $CD8^{+}$Т-клетки, индуцируют ангиогенез и др. [14, 29, 30]. Неклассические ($CD14^{lo}CD16^{+}$) являются патрулирующими моноцитами, предшественниками резидентных макрофагов, ответственны за активацию $CD4^{+}$Т-клеток и выработку IL-4, обнаружение вирусов, противоинфекционный иммунитет, секретируют высокие уровни TNFα, IFNα, IL-1β и др. [15, 17, 26, 29, 30]. Направление дифференцировки моноцитов в субпопуляции регулируется действием системных факторов, в том числе бактериального происхождения [9, 16, 17, 23, 26].

Процесс активации эффекторных $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$Т-лимфоцитов проявляется пролиферацией клеток с последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации [8, 13, 24]. Контроль за силой и продолжительностью пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов и иммунного ответа осуществляют в том числе регуляторные Т-клетки. Регуляторные Т-клетки относятся к субпопуляции $CD3^{+}CD4^{+}$Т-клеток с высоким уровнем экспрессии $CD25^{hi}$ и низкой экспрессией $CD127^{-}$ маркеров на поверхности клеток ($CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$). При связывании TCR с антигеном Treg приобретают способность ингибировать пролиферацию Т-эффекторов прямыми контактами через связывание поверхностных молекул CTLA-4 на Treg-клетках с CD80/CD86-молекулами (естественные Treg) на эффекторных Т-клетках или местную секрецию цитокинов IL-10, TGF-β (индуцибельные Treg) [6, 7, 8, 13]. Естественные Treg дифференцируются непосредственно в тимусе. Индуцибельные Treg-клетки формируются в периферических лимфоидных органах из Т-клеток под влиянием различных факторов, в том числе при контакте с дендритными клетками, макрофагами, цитокинами IL-10 и TGF-β и др. Вслед за этим активированные индуцибельные Treg-клетки синтезируют IL-10 и TGF-β, под влиянием которых подавляются аутоиммунные реакции. Недостаточность или дисфункция Treg может привести к развитию аутоиммунных заболеваний [28]. Естественные Treg более эффективно супрессируют аутореактивные Т-клетки, индуцибельные Treg – при инфекциях, трансплантации, системных воспалительных аутоиммунных и аллергических заболеваниях [8, 11].

Естественными стимуляторами иммунной системы являются микроорганизмы (МО), отдельные компоненты которых могут обладать иммуносупрессивной и иммуномодулирующей активностью. Иммунотропные препараты бактериального происхождения применяются для предотвращения гипервоспалительного процесса при развитии инфекции, усиления иммуносупрессии за счет увеличения синтеза IL-10 [25] и увеличения числа $CD4^{+}CD25^{+}$Treg-клеток [10, 27]. Основу иммуномодуляторов микробного происхождения могут составлять рибосомально-протеогликановые комплексы бактерий, лизаты [15], конкретные антигены [25], липопротеины [10].

Интерес для поиска веществ с иммуномодулирующими свойствами, могут представлять вторичные метаболиты (экзометаболиты), секретируемые МО во внешнюю среду. Экзометаболиты обеспечивают многообразные регуляторные системы адаптации и коммуникации МО во внешней среде. В состав экзометаболитов входят сигнальные молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры, способные обеспечивать как межклеточное, так и межвидовое взаимодействие [1, 3, 5]. Одни из них обладают антимикробной актив-

ностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Изменение температурных условий культивирования МО способно вызывать изменения в их росте/размножении, геномных структурах и отдельных метаболических реакциях [3].

Ранее нами был выявлен иммуномодулирующий потенциал у экзометаболитов палеобактерий *Bacillus* sp. из многолетнемерзлых пород позднего неогена. Причем установлен важный нюанс – иммунобиологическая активность экзометаболитов палеобактерий в значительной степени зависела от температуры при которой они получены [18, 19, 20]. Поиск штаммов МО, способных секретировать экзометаболиты со свойствами иммуномодуляторов, представляется актуальным.

Цель – оценить влияние экзометаболитов палеобактерий рода *Bacillus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние, на ранние механизмы формирования иммунного ответа *in vitro* в зависимости от температуры их получения.

Материалы и методы

В исследовании использован штамм 875 TS *Bacillus cereus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние голоцен-плейстоценового периода возрастом до 40 тысяч лет (район Тарко-Сале, Западная Сибирь), депонированный в ВКПМ (регистрационный № В-12242). МО культивировали на ГРМ-агаре (г. Оболенск). Для исключения попадания веществ из питательной среды в экзометаболиты смыв МО трижды отмывали в физиологическом растворе центрифугированием. МО в дозе 1×10^7 микробных клеток, инкубировали в 1 мл физиологического раствора в течение 72 часов при 5 °С (холод, Х), 22 °С (средняя температура, С) и 37 °С (тепло, Т). Клеточную взвесь пропускали через мембранные фильтры (Millipore, 0,22 мкм, White GSWP, США) и получали комплекс экзометаболитов (МБ) бактерий 3 видов – холодовые (МБ-Х), среднетемпературные (МБ-С) и тепловые (МБ-Т).

Мононуклеарные клетки (МНК) человека выделяли из гепаринизированной периферической крови 0(Rh+) на градиенте плотности DIACOLL-1077. Кровь получали от трех доноров (мужчины 25-30 лет), давших информированное добровольное согласие на взятие крови и проведение данного исследования. Культивирование МНК проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии 5% CO_2 при 37 °С в триплетах в течение 1-х, 3-х и 7-х сут. В контрольных пробах к культуре МНК добавляли полную культуральную среду. В опытных группах добавляли разные виды МБ – МБ-Х, МБ-С и МБ-Т.

Методом проточной цитометрии (цитофлуориметр CytoFLEX, Beckman Coulter, США) в гейте моноцитов определяли содержание (%) классических ($CD14^{hi}CD16^-$), промежуточных ($CD14^+CD16^+$) и неклассических ($CD14^{lo}CD16^+$) моноцитов. Для идентификации моноцитов использовали моноклональные антитела CD14-FITC и CD16-PE (Beckman Coulter, США) согласно инструкциям производителя. В гейте лимфоцитов определяли содержание (%) регуляторных (Treg, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$). хелперных $CD3^+CD4^+$ и цитотоксических $CD3^+CD8^+$Т-лимфоцитов с маркерами ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации. Для идентификации лимфоцитов использовали моноклональные антитела CD3-FITC и CD45-PE (Beckman Coulter, США) [7]. Результаты обрабатывали в программе Kaluza Analysis (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 5×10^5 клеток. В супернатантах клеточных культур методом ИФА определяли содержание IFNγ и IL-4 с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя на спектрофотометре LUCY-2(ANTHOS) (Австрия).

Анализ характера распределения исследуемых показателей соответствовал нормальному, поэтому достоверность различий между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента в программе SPSS Statistics 21 (IBM). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Для удобства анализа и наглядности результаты исследования отражены на рисунках в процентах от контрольного уровня.

Результаты

Оценка влияния экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus*, полученных при разных температурах, была проведена в три этапа. На первом этапе оценивалось влияние МБ на дифференцировку моноцитов, на втором – на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg, на третьем – на синтез цитокинов, ответственных за направленность иммунного ответа по клеточному (IFNγ) или гуморальному (IL-4) пути.

На первом этапе исследования изучено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку моноцитов. Известно, что в норме до 90% всех моноцитов составляют классические ($CD14^{hi}CD16^-$), около 10% – промежуточные ($CD14^{hi}CD16^+$) и неклассические ($CD14^{lo}CD16^+$) моноциты [12, 16, 29]. В нашем исследовании уровень субпопуляций в общем пуле моноцитов контрольных

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 1. LEVEL OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE CONTROL GROUP (%)

Субпопуляции Subpopulations	**1-е сутки** Day 1	**3-и сутки** Day 3	**7-е сутки** Day 7
$CD14^{+}CD16^{-}$	85,1±2,2	83,4±1,9	84,1±2,4
$CD14^{+}CD16^{+}$	9,4±0,9	10,7±0,9	10,8±0,9
$CD14^{lo}CD16^{+}$	5,4±0,6	5,8±0,7	5,1±0,6

групп в динамике наблюдения (табл. 1) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК и соответствовал литературным данным.

В опытных группах (рис. 1) под влиянием всех видов МБ регистрируется снижение уровня классических $CD14^{hi}CD16^{-}$ моноцитов по сравнению с контролем. Максимально снижается уровень классических моноцитов при воздействии «тепловых» метаболитов ($p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования МНК). На этом фоне, соответственно, возрастают уровни промежуточных и неклассических моноцитов. Уровень субпопуляции промежуточных $CD14^{+}CD16^{+}$ моноцитов максимально возрастает под влиянием «холодовых» МБ (на 3-и сутки в 3 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования). Активность дифференцировки моноцитов в субпопуляцию неклассических $CD14^{lo}CD16^{+}$ моноцитов наиболее значимо возрастает под влиянием «тепловых» МБ (в 1-е сутки в 5,5 раза по сравнению с контролем, $p < 0,01$ на 1-3-7-е сутки культивирования МНК). Причем активность дифференцировки неклассических моноцитов в 1,5-2 раза выше, чем активность дифференцировки промежуточных моноцитов.

Из литературных данных известно, что каждая субпопуляция играет определенную роль в развитии иммунологических процессов [14, 15, 17, 26, 29, 30]. Сопоставляя известные данные с полученными результатами, можно предположить, что метаболиты палеобактерий, в зависимости от температуры их получения, способны индуцировать дифференцировку моноцитов в разные субпопуляции и, как следствие, модулировать направленность иммунного ответа. Для подтверждения этого предположения нами были проведены 2-й и 3-й этапы исследования.

На втором этапе исследования было оценено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg. Известно, что процесс дифференцировки антигенспецифических Т-лимфоцитов в эффекторные $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$Т-лифоциты сопровождается последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации. Уровень CD69 повышается через 3-12 часов после стимуляции TCR, CD25 – в течение 24 часов, а HLA-DR экс-

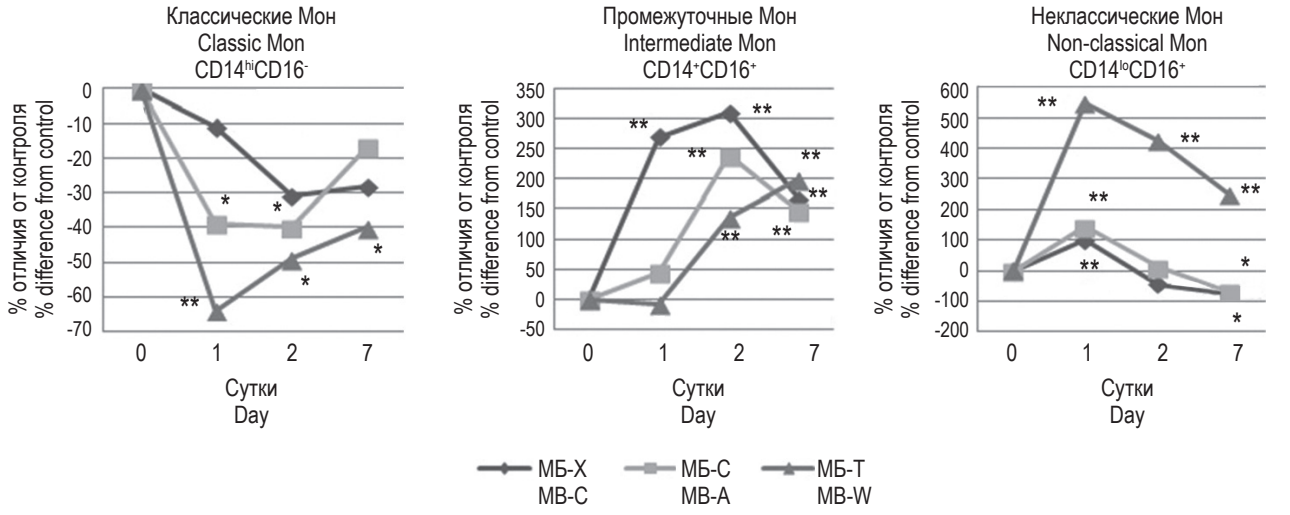

Рисунок 1. Влияние МБ палеобактерий на уровни субпопуляций моноцитов *in vitro*

Примечание. Достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Figure 1. Effect of MB of paleobacteria on the levels of monocyte subpopulations *in vitro*

Note. The significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: *, p < 0.05; **, p < 0.01.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ РАННЕЙ (CD69), СРЕДНЕЙ (CD25) И ПОЗДНЕЙ (HLA-DR) АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ TREG ($CD4^+CD25^{HI}CD127^-$) В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 2. EXPRESSION OF MARKERS OF EARLY (CD69), MID (CD25) AND LATE (HLA-DR) ACTIVATION OF T LYMPHOCYTES AND THE LEVEL OF TREG ($CD4^+CD25^{HI}CD127^-$) IN THE CONTROL GROUP (%)

Маркеры активации Activation markers	**1-е сутки** Day 1	**3-и сутки** Day 3	**7-е сутки** Day 7
$CD3^+CD4^+CD69^+$	5,4±0,4	1,9±0,2**	0,22±0,03**
$CD3^+CD4^+CD25^+$	2,1±0,2	3,00±0,27*	0,50±0,04**
$CD3^+CD4^+$HLA-DR^+	0	0,70±0,05	3,8±0,3**
$CD3^+CD8^+CD69^+$	6,20±0,54	1,90±0,17**	0,38±0,03**
$CD3^+CD8^+CD25^+$	1,90±0,13	5,50±0,48**	0,80±0,07**
$CD3^+CD8^+$HLA-DR^+	0	1,30±0,11	4,10±0,35**
$CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$	6,90±0,58	6,40±0,36	6,10±0,47

Примечание. Достоверность отличия показателя в данной группе от показателя в предыдущей группе: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. Reliability of the difference between the indicator in this group and the indicator in the previous group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

прессируется на мембране клеток примерно через 48 часов после активации [11, 24, 28].

В нашем исследовании показано, что в контрольных пробах (табл. 2) у $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов четко прослеживается динамика изменения экспрессии маркеров ранней активации с CD69 (максимум 1-е сутки) на маркеры средней активации CD25 (3-и сутки), затем на экспрессию маркеров поздней активации HLA-DR (7-е сутки), что вполне согласуется с литературными данными [13, 24].

В опытных группах (рис. 2) установлено, что метаболиты палеобактерий оказали значимое влияние на активность и направленность дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Причем это влияние в значимой степени зависело от вида метаболитов. «Тепловые» метаболиты (МБ-Т) преимущественно стимулируют дифференцировку $CD4^+$Т-лимфоцитов, а «холодовые» метаболиты (МБ-Х) – активность дифференцировки $CD8^+$Т-лимфоцитов. Об этом свидетельствует в том и другом случае повышение уровней экспрессии ранних маркеров активации (CD69) на 1-е сутки, маркеров средней активации (CD25) на 3-и сутки и HLA-DR на 7-е сутки культивирования МНК, что можно считать классикой дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Тем не менее активность дифференцировки $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов между собой различается. Так, уровень экспрессии активационных маркеров на мембране $CD8^+$Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Х практически в 2-4 раза выше, чем у $CD4^+$Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Т в процессе их дифференцировки.

Контроль за силой и продолжительностью иммунного ответа осуществляют, в том числе, регуляторные Т-лимфоциты (Treg). В нашем исследовании уровень экспрессии маркеров Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) в контроле (табл. 2) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК.

В опытных группах (рис. 3) по сравнению с контролем на активность дифференцировки индуцибельных Treg наиболее значимое стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты (на 1-3-и сутки $p < 0,01$ и на 7-е сутки $p < 0,05$). Под влиянием «холодовых» метаболитов уровень индуцибельных Treg был повышен на 1-3-и сутки ($p < 0,01$). «Среднетемпературные» метаболиты не оказали достоверного влияния на уровень Treg ($p > 0,05$ в динамике наблюдения). Из этого мы делаем вывод, что метаболиты палеобактерий способны стимулировать активность индуцибельных Treg. Причем степень этой стимуляции можно направленно модулировать изменением температуры преинкубации бактерий при получении метаболитов. Супрессивная активность индуцибельных Treg под влиянием «холодовых» МБ в большей степени ассоциируется со снижением активности дифференцировки $CD4^+$Т-лимфоцитов (в 2-3 раза по сравнению с уровнем активности $CD8^+$Т-лимфоцитов). Под влиянием «тепловых» МБ супрессивная активность индуцибельных Treg в большей степени ассоциируется со снижением активности дифференцировки цитотоксических $CD8^+$Т-лимфоцитов (в 3-4 раза по сравнению с уровнем активности $CD4^+$Т-лимфоцитов).

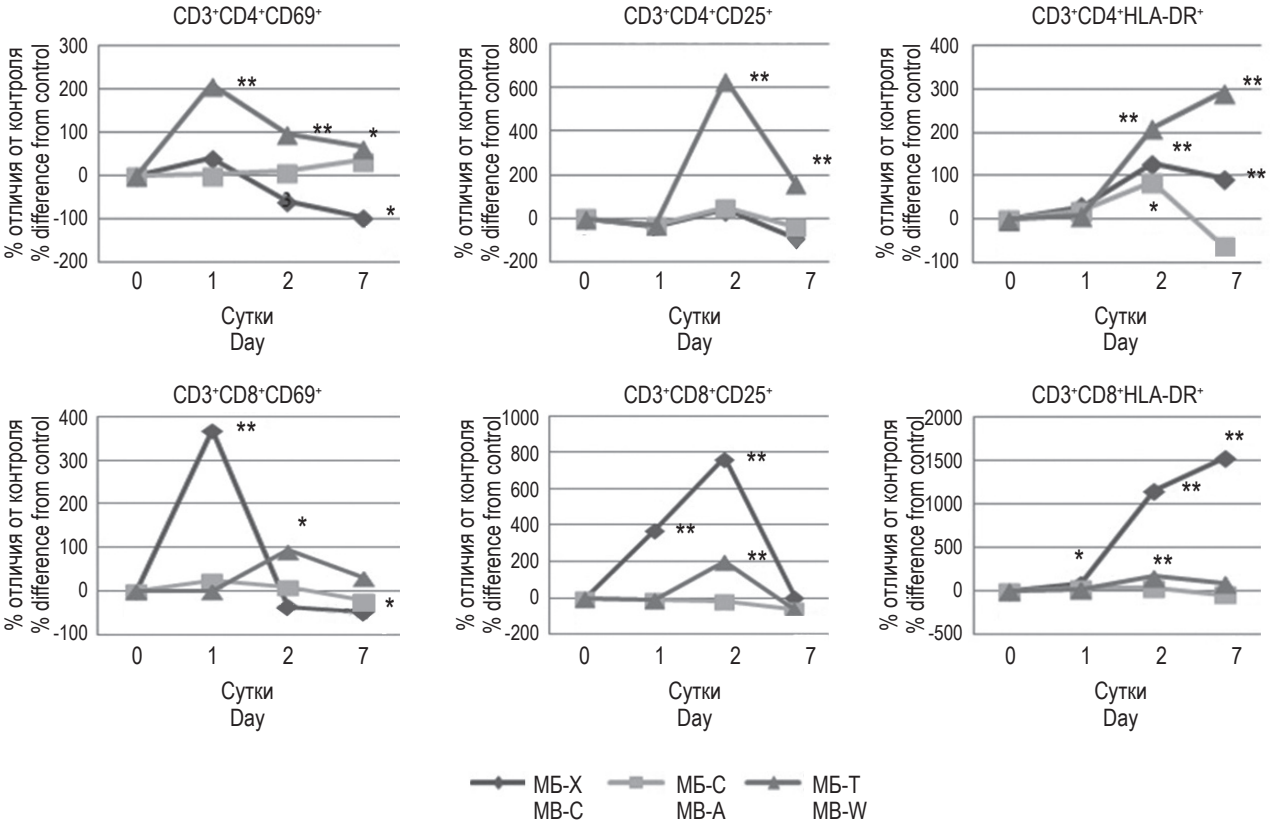

Рисунок 2. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. The influence of MB paleobacteria on the differentiation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes
Note. As for Figure 1.

На третьем этапе исследования в супернатанте клеточной культуры МНК было определено содержание IFNγ и IL-4. Как показало наше исследование (рис. 4), на синтез Th-репетуарного цитокина IFNγ все три вида метаболитов МО оказали в той или иной степени выраженное достоверное стимулирующее влияние. Наиболее выраженное стимулирующее влияние на синтез IFNγ оказали «холодовые» метаболиты: через сутки совместного культивирования МНК с МБ-Х уровень IFNγ резко увеличился (в 15 раз по сравнению с контролем), к 7-м суткам снизился практически до контроля. Под влиянием МБ-Т максимум увеличения уровня IFNγ наблюдается на 3-и сутки – в 10 раз, под влиянием МБ-С – в 8 раз также на 3-и сутки.

ТАБЛИЦА 3. СООТНОШЕНИЕ УРОВНЕЙ IFNγ/IL-4

TABLE 3. IFNγ/IL-4 LEVEL RATIO

Группы Groups	**0-е сутки** Day 0	**1-е сутки** Day 1	**3-и сутки** Day 3	**7-е сутки** Day 7
Контроль Control	1,60±0,12	1,60±0,18	1,8±0,2	2,2±0,3
МБ-Х MB-C	1,60±0,12	22,80±1,73**	17,30±1,54**	5,50±0,61**
МБ-С MB-A	1,60±0,12	5,50±0,62**	15,40±1,33**	4,00±0,36**
МБ-Т MB-W	1,60±0,12	2,40±0,35*	4,80±0,57**	3,90±0,44**

Примечание. Достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Note. Reliability of differences in indicators in the experimental group from the control: *, p < 0.05; **, p < 0.01.

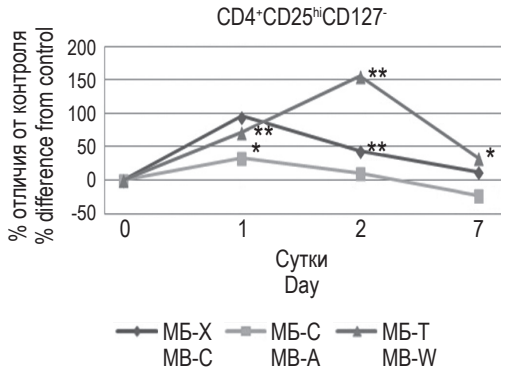

Рисунок. 3. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку Treg (CD4+CD25hiCD127-)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure. 3. Effect of MB paleobacteria on Treg differentiation (CD4+CD25hiCD127-)

Note. As for Figure 1.

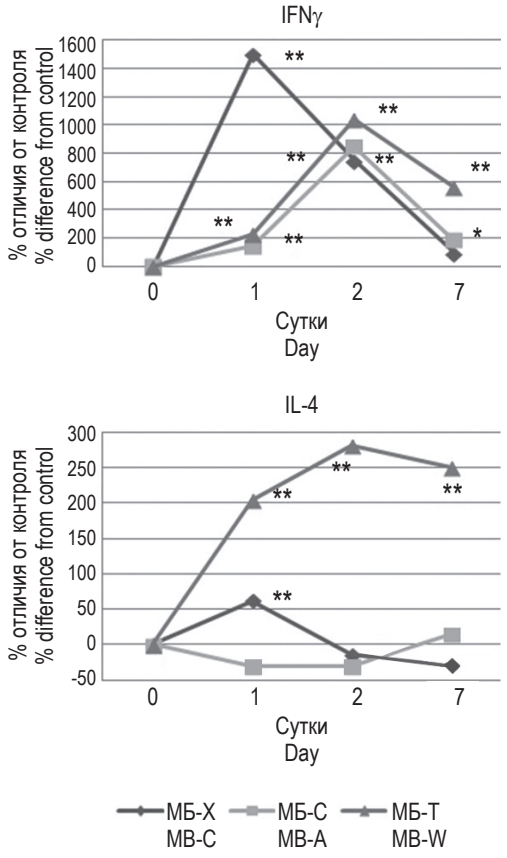

Рисунок. 4. Влияние МБ палеобактерий на синтез IFNγ и IL-4

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure. 4. The influence of paleobacterial MB on the synthesis of IFNγ and IL-4

Note. As for Figure 1.

На синтез Th2-репетуарного цитокина IL-4 выраженное стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты. Под влиянием МБ-Т активность синтеза IL-4 сохранялась на повышенном уровне (в 2-2,8 раза по сравнению с контролем) на протяжении всего срока наблюдения ($p < 0,01$). Под влиянием МБ-Х активность синтеза IL-4 увеличилась только через сутки на 60% относительно контрольного уровня ($p < 0,01$). МБ-С не оказали достоверного влияния на синтез IL-4.

Причем во всех опытных группах, независимо от вида метаболитов, баланс между цитокинами IFNγ и IL-4 (табл. 3) был сдвинут в сторону IFNγ, а соотношение IFNγ/IL-4 в опытных группах значимо превышало таковой в контрольной группе для всего срока культивирования МНК. Например, под влиянием МБ-Х на 3-и сутки соотношение IFNγ/IL-4 было более чем в 20 раз, под влиянием МБ-С – в 15 раз, под влиянием МБ-Х – почти в 5 раз ($p < 0,01$ для всех случаев) выше контрольного.

Эти данные показывают, что под действием метаболитов палеобактерий баланс между Th1- и Th2-зависимым иммунным ответом смещается в сторону Th1-зависимого.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают значимой иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью. Под влиянием экзометаболитов палеобактерий проявляются как общие закономерности, так и особенности формирования иммунного ответа на чужеродные антигены.

К общим закономерностям проявления иммуностимулирующей способности экзометаболитов палеобактерий можно отнести характерную динамику и последовательность активации механизмов развития иммунного ответа: значимая активация дифференцировки моноцитов в субпопуляции промежуточных и неклассических моноцитов; активация дифференцировки эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов со сменой маркеров ранней, средней и поздней активации; увеличение уровня Treg и синтеза цитокинов IFNγ и IL-4 относительно контрольных уровней данных показателей.

К особенностям формирования иммунного ответа на антигены экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа получения МБ – «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5 °С), «среднетемпературные» (22 °С) и «тепловые» (37 °С) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют пре-

имущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно – дифференцировку промежуточных $CD14^+CD16^+$ моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD8^+$Т-лимфоцитов и синтеза IFNγ. «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно – дифференцировку неклассических $CD14^{lo}CD16^+$ моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD4^+$Т-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые 3 суток культивирования клеток активность дифференцировки $CD8^+$Т-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой $CD4^+$Т-лимфоцитов, а уровень секреции IFNγ превышает уровень IL-4. На 3-и сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к нормализации баланса между IFNγ(Th1) и IL-4(Th2) к 7-м суткам.

Прослеживается четкое влияние Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что, с одной стороны, препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой – не приводят к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3-и сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина IFNγ. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

Полученные данные, с одной стороны, в значительной степени согласуются с известными данными о влиянии МО на иммунную систему [3, 22], с другой – дают нам новый способ селективной модуляции направленности иммунного ответа экзометаболитами палеобактерий. Базисом данного способа является фактор температуры при получении экзометаболитов. Зависимость общей жизнедеятельности МО от температурного фактора общеизвестна. В частности, изменение температурных условий культивирования МО может оказывать влияние на их рост, размножение, геномные структуры, метаболические реакции [2, 3]. Установлено, что в состав метаболитов при стандартных условиях культивирования МО (37 °С) входят сигнальные молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры [4], которые могут обладать антимикробной активностью, фармакологической активностью, являться специфическими ингибиторами ферментов, ростовыми факторами [1, 2, 3, 4, 22]. Однако практически отсутствует информация об особенностях состава и функциональной активности экзометаболитов, полученных в различных температурных условиях внешней среды.

Заключение

Проведенное нами ранее изучение «холодовых» экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* показало, что в их состав входят особые низкомолекулярные фракции углеводов – олигомеры, имеющие в своей основе двухосновный алкалоид и цепь из звеньев этиленгликоля в виде «гребенки» [21]. Данные фракции углеводов обладают иммуномодулирующим потенциалом, который на 30% слабее, чем цельный комплекс метаболитов. Следует отметить, что в качестве контрольного был использован современный штамм *Bacillus cereus* из лекарственного препарата «Бактисубтил» (Франция). У современного штамма данные фракции углеводов не секретировались. Известно, что количество информации, содержащейся в углеводах (например, в полисахаридах клеточной стенки) значительно больше, чем это необходимо для выполнения чисто механических функций. Роль углеводов в кодировании биологически значимой информации (в том числе влиянии на иммунореактивность организма) на наш взгляд несколько недооценивается.

Проведенное исследование показало, экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают выраженной иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью.

Список литературы / References

1. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // Микробиология, 2006. Т. 75, № 4. С. 483-488. [Vakhitov T.Y., Petrov L.N. Regulatory functions of bacterial exometabolites. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya, 2006, Vol. 75, pp. 415-419.* (In Russ.)]

2. Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий // Прикладная биохимия и микробиология, 2004. Т. 40, № 3. С. 261-269. [Vorob'eva L.I. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A Review.

Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology, 2004, Vol. 40, pp. 217-224. (In Russ.)]

3. Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология, 2008. Т. 75, № 4. С. 489-496. [Nikolaev Y.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Y., El-Registan G.I. Autoregulation of stress response in microorganisms. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya, 2008, Vol. 75, pp. 420-426.* (In Russ.)]

4. Проворов Н.А., Тихонович И.А. Генетические и молекулярные основы симбиотических адаптаций // Успехи современной биологии, 2014. Т. 134, № 3. С. 211–226. [Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Genetic and molecular basis of symbiotic adaptations. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews, 2014, Vol. 4, pp. 443-456.* (In Russ.)]

Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Карнышева Э.А., Брушков А.В., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. Бактериофаги низкотемпературных систем Арктики и Антарктики // Микробиология, 2016. Т. 85, № 3. С. 337-346. [Filippova S.N., Surgucheva N.A., Sorokin V.V., Akimov V.N., Karnysheva E.A., Brushkov A.V., Andersen D., Galchenko V.F. Bacteriophages of low-temperature systems of the Arctic and Antarctic. *Mikrobiologiya = Mikrobiologiya, 2016, Vol. 85, pp. 337-346.* (In Russ.)]

5. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 347-354. [Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 347-354.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-347-354.

6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 1. С. 7-16. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Analysis of T helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers) by means of flow cytometry. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 7-16.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-1-7-16.

7. Athanassakis I., Vassiliadis S. T-regulatory cells: are we rediscovering T suppressor? *Immunol. Lett., 2002, Vol. 84, no. 3, pp. 179-183.*

8. Azeredo E.L., Neves-Souza P.C., Alvarenga A.R., Reis S.R.N.I., Torrentes-Carvalho A., Zagne S.O., Nogueira R.M.R., Oliveira-Pinto L.M., Kubelka C.F. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology, 2010, Vol. 130, no. 2, pp. 202-216.* Caramalho I., Lopes Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med, 2003, Vol. 197, pp. 403–411.* DOI: 10.1084/jem.20021633 PMCID: PMC2193858

9. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol., 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 946-953.*

10. During M., Cabanillas Stanchi K.M., Haufe S., Erbacher A., Bader P., Handgretinger R., Hofbeck M., Kerst G. Patterns of monocyte subpopulations and their surface expression of HLA-DR during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol., 2015, Vol. 94, no. 5, pp. 825-836.*

11. Fontenot J., Rudensky A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol., 2005, Vol. 6, no. 4, pp. 331-337.*

12. Guilliams M., Mildner A., Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity, 2018, Vol. 49, no. 4, pp. 595-613.*

13. Hijdra D., Vorselaars A.D.M., Grutters J.C., Claessen A.M.E., Rijkers G.T. Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Front. Immunol., 2013, Vol. 4, 339.* doi: 10.3389/fimmu.2013.00339.

14. Jenkins S.J., Ruckerl D., Thomas G.D., Hewitson J.P., Duncan S., Brombacher F., Maizels R.M., Hume D.A., Allen J.E. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exp. Med., 2013, Vol. 210, no. 11, pp. 2477-2491.*

15. Ka M.B., Olive D., Mege J.L. Modulation of monocyte subsets in infectious diseases. *World J. Immunol., 2017, Vol. 4, no. 3, pp. 185-193.*

16. Kalenova L.F., Novikova M.A., Kostolomova E.G. Effects of low-doses of bacillus spp. From permafrost on differentiation of bone marrow cells. *Bull. Exp. Biol. Med., 2015, Vol. 158, no. 3, pp. 364-367.*

17. Kalyonova L.F., Novikova M.A., Subbotin A.M., Bazhin A.S. Effects of temperature on biological activity of permafrost microorganisms. *Bull. Exp. Biol. Med., 2015, Vol. 158, no. 6, pp. 772-775.*

18. Kalenova L.F., Kolyvanova S.S., Bazhin A.S., Besedin I.M., Mel'nikov V.P. Effects of secondary metabolites of permafrost bacillus sp. On cytokine synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *Bull. Exp. Biol. Med., 2017, Vol. 163, no. 2, pp. 235-238.*

19. Kalenova L.F., Petrov S.A., Sukhovei Y.G. Reparative and Immunomodulatory Potential of Low-Molecular-Weight Fractions of Secondary Metabolites of Bacillus sp. *Bull. Exp. Biol. Med., 2022, Vol. 172, no 3, pp. 332-335.*

20. Ritchie A.J., Jansson A.P., Stallberg J.P., Nilsson P., Lysaght P., Cooley M.A. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect. Immun., 2005, Vol. 73, no. 3, pp. 1648-1655.*

21. Rodriguez-Mucoz Y., Martin-Vilchez S., Lypez-Rodriguez R., Hernández-Bartolomé A., Trapero-Marugán M., Borque M.J., Moreno-Otero R., Sanz-Cameno P. Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther., 2011, Vol. 34, no. 8, pp. 960-971.*

22. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.*

23. Sing A., Rost D., Tvardovskaia N., Roggenkamp A., Wiedemann A., Kirschning C.J., Aepfelbacher M., Heesemann J. Yersinia V antigen exploits toll like receptor 2 and CD14 for interleukin 10 mediated immunosuppression. *J. Exp. Med., 2002, Vol. 196, no. 8, pp. 1017-1024.*

24. Smeekens S.P., van de Veerdonk F.L., Joosten L.A.B., Jacobs L., Jansen T., Williams D.L., Meer J.W.M., Kullberg B.J., Netea M.G. The classical $CD14^{++}CD16^{-}$ monocytes, but not the patrolling $CD14^{+}CD16^{+}$ monocytes, promote Th17 responses to Candida albicans. *Eur. J. Immunol., 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 2915-2924.*

25. Sutmuller R.P.M., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O., Adema G.J. Toll like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol., 2006, Vol. 27, no. 8, pp. 387-393.*

26. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem., 2016, Vol. 49, no. 4-5, pp. 347-354.*

27. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res., 2012, Vol. 53, no. 1-3, pp. 41-57.*

28. Wong K.L., Jing Yi, Tai J., Wong W., Han H., Sem X., Yeap W., Kourilsky P., Wong S. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and non-classical human monocyte subsets. *Blood, 2011, Vol. 118, no. 5, pp. 16-32.*

Авторы:

Петров С.А. *— д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия*

Калёнова Л.Ф. *— д.б.н., главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия*

Суховей Ю.Г. *— д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия*

Authors:

Petrov S.A., *PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*

Kalyonova L.F., *PhD, MD (Biology), Chief Researcher, Department of Cryosphere, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*

Sukhovey Yu.G., *PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*

Костоломова Е.Г. *– к.б.н., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия*

Бажин А.С. *– младший научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия*

Нарушко М.В. *– младший научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Тюмень, Россия*

Kostolomova E.G., *PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation*

Bazhin A.S., *Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*

Narushko M.V., *Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources, Tyumen Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation*

Поступила 10.07.2025
Принята к печати 31.05.2025

Received 10.07.2025
Accepted 31.05.2025