

ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА И ЭСТРАДИОЛА НА ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРСИСТЕРОВ В КУЛЬТУРАХ СТАФИЛОКОККОВ, ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА, И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ГОЛОДАНИЮ И СТРЕССУ НОВОЙ СРЕДЫ

© 2022 г. Т. А. Панкратов^а *, Ю. А. Николаев^а, А. В. Ганнесен^а, Г. И. Эль-Регистан^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.01.2022 г.

После доработки 20.01.2022 г.

Принята к публикации 20.01.2022 г.

Влияние гормонов, синтезируемых как организмом человека, так и его микробиотой, на рост симбиотрофных и сапротрофных бактерий хорошо известно. Однако о влиянии гормонов на образование и выживание клеток-персистеров как фенотипа, обеспечивающего выживание популяции при действии биоцидных доз антибиотиков, информации нет. Поэтому целью работы было изучить *in vitro* влияние факторов гуморальной регуляции человека – катехоламинов адреналина (А) и норадреналина (НА), а также стероидного гормона эстрадиола, на частоту образования персистеров (П) и их выживание при резкой смене условий культивирования – голодании с последующим переносом П в свежую богатую среду. В настоящей работе впервые показано, что А и НА влияют на рост культур микроорганизмов, которые могут быть обитателями кожи человека – *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis*, а также на частоту образования антибиотикотолерантных и устойчивых к лизирующим воздействиям клеток-персистеров в зависимости от концентрации А и НА. Новая информация получена при исследовании влияния катехоламинов и эстрадиола на выживание П *S. epidermidis* при резкой смене условий инкубации. При длительном (12 ч) голодании в 0.9% NaCl присутствие А и НА в физиологической (ф) (4.9 и 3.6 нМ) и более высоких – 10ф и 100ф концентрациях не влияло на выживание П, численность которых в контрольных и опытных вариантах снижалась на 2 порядка (от 10⁸ до 10⁶ КОЕ/мл). На стресс богатой среды, вызывающий, так называемую “ускоренную субстратом смерть клеток” А не влиял, тогда как НА во всех концентрациях вызывал переход П в некультивируемое состояние с последующей их ресусцитацией – возвратом способности образовывать колонии. Эстрадиол в физиологической (0.22 нМ) концентрации также не влиял на выживание П в условиях голодания, а в более высоких дозах – 10ф и 100ф защищал П от стресса голодания, их численность снижалась только в 2 раза. От стресса богатой среды, напротив, защищали только высокие 10ф и 100ф концентрации эстрадиола. Получена новая информация о существенном влиянии факторов гуморальной регуляции человека на: (1) частоту образования П в культурах компонентов микробиоты человека *S. aureus* и *S. epidermidis*; (2) выживание П в условиях голодания и (3) их реверсию к росту в свежей среде, то есть в условиях, которые имеют место в организме человека. Полученная информация может быть полезна при разработке медикаментозных и косметических препаратов для кожи.

Ключевые слова: микробиота человека, персистеры, гормоны человека, стресс, *Staphylococcus*

DOI: 10.31857/S0026365622300061

В литературе имеется обширная информация о влиянии катехоламинов (адреналина, норадреналина и др.) как факторов гуморальной регуляции человека, синтезируемых также микроорганизмами, как сапротрофами, так и симбионтами животных и человека, на рост свободноживущих и симбиотических бактерий и дрожжей (Lyte, 2016; Олескин и соавт., 2020). Показана также стимуляция синтеза катехоламинов в ответ на

стрессорные воздействия (Lyte, 2014), к которым можно отнести стресс новой среды, возникающий при переносе стационарных микробных культур, как инокулюма, в свежую среду (Николаев, 2004; Бухарин и соавт., 2005; Bertrand, 2019). Поэтому как повышение, так и понижение концентрации катехоламинов в лаг-фазе микробной культуры закономерно влияют на ее рост. Дозозависимое действие катехоламинов на развитие

микробных популяций, их планктонный рост, адгезию и биопленкообразование показано для многих бактерий, в том числе кожных симбионтов человека *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* (Lyte, 2003; Freestone et al., 2008; Олескин и соавт., 2020; Mart'yanov et al., 2021).

Рассматривают два возможных механизма действия нейроактивных катехоламинов на рост бактериальных культур: 1) их способность хелатировать Fe^{+3} , делая его доступным для бактерий (Freestone et al., 2000); 2) их функционирование как аналогов аутоиндукторов QS-системы (Bansal et al., 2007; Trueba, Ritz, 2013). Их действие как “триггеров”, активирующих рост и деление клеток в начальной фазе онтогенеза микробной культуры, аналогично действию некоторых других микробных ауторегуляторов (Олескин, Шендеров, 2020).

Катехоламины химически сходны с ароматическими спиртами, функционирующими как ауторегуляторы, контролирующие цитодифференцировку у бактерий (Эль-Регистан и соавт., 2006) и дрожжей (Chen, Fink, 2006). У дрожжей был выделен структурно схожий с предшественником катехоламинов ауторегулятор тирозол (Батраков и соавт., 1993; Chen et al., 2004), а у ряда бактерий – алкилоксибензолы (Осипов и соавт., 1988), относящиеся к семейству алкилрезорцинов и контролирующие образование цистоподобных покоящихся форм (ПФ) у многих представителей прокариот и у дрожжей (Эль-Регистан и соавт., 2006). Таким образом, плейотропное действие катехоламинов в зависимости от их структуры и концентраций может не только быть причиной изменения роста микробных культур, но и влиять на цитодифференцировку микроорганизмов, сопряженную с изменением транскрипционных программ, в том числе влиять на фенотипический переход ординарных клеток в фенотип персистеров (П) (Balaban et al., 2004, 2019).

Воздействие эстрадиола на бактерии менее изучено. Есть сведения о том, что эстрадиол снижает частоту и клиническую тяжесть артрита, вызванного *S. aureus* у мышей (Gjertsson et al., 2012). На примере *Lactobacillus crispatus*, основного вида бактерий вагинальной микробиоты, было показано, что 17β -эстрадиол (от 10^{-6} до 10^{-10} М) не оказывает влияния на рост *L. crispatus*, но заметно влияет на динамику мембран этой бактерии (Clabaut et al., 2021). Этот эффект, по-видимому, соответствует процессу сигнальной трансдукции. Для *E. coli* показано (Engelsoy et al., 2021), что эстрадиол дозозависимым образом увеличивает экспрессию адгезинов fimH и rapC и усиливает колонизацию и инвазию эпителиальных клеток мочевого пузыря человека. А также эстрадиол способен снижать летальность у червей *Caenorhabditis elegans*, инфицированных *E. coli*. Однако влияние этого гормо-

на на персистеры бактерий никогда ранее не исследовалось.

Персистеры – это клетки малочисленной субпопуляции, образующиеся стохастически в фазе логарифмического роста бактериальной культуры (персистеры II типа) или под влиянием стрессорных воздействий, например, голодания, и сопряженных с этим клеточных событий, в стационарной фазе (персистеры I типа) (Lewis, 2010; van der Bergh et al., 2017; Balaban et al., 2019). Персистеры – это клетки: 1) не делящиеся или очень медленно делящиеся; 2) с крайне замедленным метаболизмом; 3) устойчивые к индукции аутолиза; 4) выживающие в присутствии летальных доз антибиотиков (антибиотикотолерантные); 5) при переносе в свежую среду ревертирующие к вегетативному фенотипу и воспроизводящие родительскую популяцию чувствительных к антибиотиками клеток с образованием вновь малочисленной субпопуляции клеток-персистеров (Gerdt et al., 2013; van der Bergh et al., 2017; Dawson et al., 2021).

С самого начала их открытия в популяциях *S. aureus*, выживающих в присутствии летальных доз пенициллина (Hobby et al., 1942; Bigger, 1944), персистеры рассматриваются как причина рецидивов хронических инфекций, а в настоящее время и как базовый фенотип в развитии антибиотикорезистентности (van der Bergh et al., 2017; Levin-Reisman et al., 2018; Balaban et al., 2019; Goormaghtigh, Van Melderen, 2019; Lewis, 2020). Однако, несмотря на широкий фронт исследований в области изучения персистеров, влияние на их образование и выживание биотических факторов до сих пор остается мало исследованным. Особый интерес представляет изучение влияния факторов гуморальной регуляции человека на частоту образования персистеров I типа, которые, согласно гипотезе авторов статьи, являются предшественниками покоящихся форм, в которых прошли процессы цитодифференцировки, но не завершены процессы синтеза специфических структур форм покоя и развития анабиотического состояния (Лойко и соавт., 2015; Мулюкин и соавт., 2015). Численность персистеров I типа в стационарных культурах бактерий составляет от долей до нескольких процентов. В процессе пролонгированного культивирования бактерий основная масса стационарных клеток популяции аутолизирована, и образовавшийся аутолизат (клеточные останки и продукты гидролиза клеточных биополимеров) способствует образованию и необходим для поддержания жизнеспособности персистеров и их созревания в покоящиеся анабиотические формы (Бухарин и соавт., 2005; Эль-Регистан и соавт., 2006; Podlesek et al., 2016, 2020). При этом отсутствует информация о выживании персистеров в условиях полного голодания, а также о влиянии

факторов гуморальной регуляции на их выживание при резкой смене условий культивирования.

Целью настоящего исследования было изучить влияние факторов гуморальной регуляции, гормонов – нейромедиаторов адреналина и норадреналина и стероидного гормона эстрадиола, на частоту образования персистеров в культурах штаммов бактерий, являющихся представителями кожной микробиоты человека, а также на выживание персистеров в условиях голодания и их способность ревертировать к росту в полноценной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Объектами исследования были штаммы видов-представителей кожной микробиоты человека – *S. aureus* ATCC6538; и *S. epidermidis* ATCC14990.

Инокулят готовили, внося 1 петлю бактериальной массы 48-ч поверхностной культуры бактерий в 20 мл модифицированной среды RCM (г/л: дрожжевой экстракт – 13; пептон – 10; глюкоза – 5; NaCl – 5; ацетат аммония – 3), и инкубировали при перемешивании на шейкере Biosan T-104 (180 об./мин) и температуре 34°C в течение 24 ч. Среда RCM, содержащая глюкозу, использовалась для увеличения эффективности культивирования тестируемых культур, что было проверено в предварительных экспериментах. Выросшую культуру использовали как инокулят, перенося в свежую питательную среду (1 и 2 мл) в пробирках (объем 15 мл) аликвоту объемом 10 и 20 мкл. В опытных вариантах вместе с инокулятом в пробирки вносили растворы гормонов (“Merck”, Германия) в физиологической (ф), 10-кратной (10ф) и 100-кратной (100ф) концентрациях. В работе исследовали воздействие растворов усредненных физиологических концентраций гормонов, характерных для биологических жидкостей человека: для адреналина – 4.9×10^{-9} М; норадреналина – 3.6×10^{-9} М; эстрадиола – 0.22×10^{-9} М. Подготовленные таким образом пробирки контрольных (без внесения гормонов, К1) и опытных вариантов переносили на шейкер и инкубировали в течение 24 ч при перемешивании (180 об./мин; 34°C).

Определение численности персистеров при их селекции антибиотиками и получение кривых отмирания. Через 24 ч инкубации бактерий (стационарная фаза) из пробирок отбирали аликвоту 10 мкл и переносили как инокулят в свежую жидкую среду RCM в пробирки Эппендорфа (2 мл) с 990 мкл среды. В опытных вариантах одновременно с инокулятом вносили раствор ципрофлоксацина до конечной бактерицидной концентрации 10 мкг/мл. В контрольных вариантах (К2) антибиотик не вносили, а в качестве инокулята использовали культу-

ры без воздействия гормонов. Культуры опытных и контрольных вариантов инкубировали в течение 6–7 ч на шейкере Biosan T-104 (180 об./мин) при температуре 34°C. Периодически из пробирок отбирали аликвоту 10 мкл, трижды отмывали клетки от антибиотика физиологическим раствором (0.9% NaCl) с центрифугированием (10 мин, 10000 g, Eppendorf MicroSpin, “Eppendorf”), из отмывых клеточек готовили серийные разведения. Учет КОЕ проводили микрометодом, высевая 5 мкл суспензии соответствующего разведения в 5-кратной повторности на агаризованную среду RCM. Результаты выражали в логарифмах численности КОЕ. Кривые отмирания клеток строили согласно (Balaban et al., 2019), где кривая отмирания соответствовала гибели ординарных клеток, а образующееся плато соответствовало численности персистеров.

Определение численности персистеров при их селекции лизирующим раствором. В другой модификации экспериментов в качестве селективного агента использовали лизирующий раствор (лизоцим 20000 ед., “Applichem”, 400 мкг/мл; додецилсульфат натрия – 10 мкл 0.1% водного раствора, 20 мкл/мл), который вносили в 24-ч культуры контрольных и опытных (с гормонами) вариантов и инкубировали их в течение 10 ч, периодически отбирая пробы (Николаев и соавт., 2020). В отобранных пробах клетки отмывали физраствором от лизирующего раствора и готовили серийные разведения в физиологическом растворе. Посев и учет КОЕ проводили микрометодом как описано выше.

Влияние голодания на выживание персистеров. Культуру выращивали до стационарной фазы в течение 24 ч. Затем в культуру вносили лизирующий раствор (лизоцим из расчета 400 мкг/мл, додецилсульфат натрия, 0.1% водного раствора, 20 мкл/мл) и инкубировали в течение 7 ч при непрерывном встряхивании и температуре 34°C. По окончании обработки интактные клетки персистеров отделяли от автолизированной массы центрифугированием и промывали физраствором (10 мин, 6000 g, Eppendorf MicoSpin, “Eppendorf”). Надосадочную жидкость сливали, а осадок персистеров ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации $\sim 10^8$ кл./мл. Суспензию клеток-персистеров (2 мл) переносили в пробирки, вносили гормоны (адреналин, норадреналин, эстрадиол) в соответствующих концентрациях (Ф, 10Ф и 100Ф) и инкубировали при 34°C в течение 12 ч. После окончания инкубации клетки-персистеры снова осаждали центрифугированием, промывали физиологическим раствором, повторно осаждали и вносили 1 мл питательной среды RCM. Количество колоний, выросших из сохранивших жизнеспособность клеток-персистеров, определяли, как описано выше, отбирая пробы в течение 6 ч.

Обработка результатов. Все исследования выполнены в трех биологических повторностях по два параллельных эксперимента в каждом. При расчете титра КОЕ определяли среднее арифметическое и экспериментальную ошибку (используя функцию “среднее отклонений экспериментальных значений от среднего”) из 5–7 параллельных проб с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку, обычно не превышающую 20%, что всегда соответствовало достоверности по критерию Стьюдента для $p = 0.05$. На рисунках представлены данные типичных экспериментов в виде “среднее арифметическое \pm экспериментальная ошибка”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде исследований отмечают расхождения между лабораторными данными и клиническими определениями частоты образования персистеров патогенными бактериями (Chang et al., 2020). Неясно, какие механизмы и факторы воздействия организма хозяина вносят вклад в развитие бактериальных культур и частоту образования персистеров, их выживание и реверсию к размножению, что и обусловило формулирование цели настоящей работы – выяснить возможное влияние факторов гуморальной регуляции человека на образование персистеров и их выживание в стрессовых ситуациях.

Второй аспект возможного объяснения различий в результатах клинического и лабораторного определения численности персистеров имеет методический характер. Известны два основных метода, основанные на селективном действии на клетки бактериальных культур биоцидных доз антибиотиков. В предложенном группой Keren с сотрудниками (2010) способе антибиотик вносится в растущую культуру, и в периодически отбираемых аликвотах после отмывки антибиотика определяется число выживших клеток (КОЕ/мл). “Плато” (т.е. минимальный и стабильный уровень) КОЕ/мл, образующееся после гибели ординарных клеток, принимается как численность персистеров. В методе, описанном в работах (Balaban et al., 2004, 2019) и более широко применяющемся в настоящее время (Bacterial Persistence: Methods and Protocols, 2021), антибиотик вносится одновременно с аликвотой культуры (инокулята) в свежую ростовую среду, в которой нужно определить численность персистеров. Число персистеров определяется как КОЕ/мл в аликвотах, отмытых от антибиотика, на протяжении лаг-фазы культуры, в которой ординарные клетки лизируются, а персистеры сохраняют КОЕ-образующую способность.

При изучении влияния факторов гуморальной регуляции человека на частоту образования персистеров и их устойчивость к экстремальным стрессорным воздействиям использовали два метода селекции персистеров, основанных на их устойчивости к действию 1) биоцидных доз антибиотика ципрофлоксацина по методу (Balaban et al., 2019) и 2) лизирующего раствора, индуцирующего лизис ординарных клеток, как модификацию метода (Canas-Duarte et al., 2014).

Сравнение методов изоляции персистеров

Приведенные на рис. 1 кривые отмирания стационарных культур *S. epidermidis* и *S. aureus* при воздействии на них раствором ципрофлоксацина биоцидной концентрации демонстрируют типичную картину снижения численности КОЕ/мл, обусловленного гибелью ординарных вегетативных клеток, с выходом на плато, сформированном сохраняющими жизнеспособность клетками-персистерами (после 3 ч для *S. epidermidis* и после 6 ч для *S. aureus*). Отмирание стационарных клеток начиналось после небольшого лаг-периода в обеих культурах, выход на плато наблюдался раньше у *S. epidermidis*. Численность персистеров в обеих культурах составляла около 0.8–1.2%. Отметим, что в стационарных культурах бактерий субпопуляция выживающих клеток (плато) формируется суммарно персистерами I и II типов, где, согласно литературным данным, основную долю составляют персистеры I типа, образующиеся в стационарной фазе роста (van der Bergh et al., 2017; Balaban et al., 2019).

При использовании в качестве селективного агента лизирующего раствора кривая отмирания клеток стационарных культур *S. aureus* (рис. 2) принципиально имела такой же характер, что и при селекции антибиотиками. Отличия состояли в более выраженном ступенчатом характере кривой отмирания клеток, где первая ступень (5–7 ч) формируется при лизисе ординарных стационарных клеток и временном выживании персистеров II типа, менее устойчивых к лизирующему раствору, чем персистеры I типа. Второе плато соответствует оставшимся жизнеспособными персистерам I типа (более 9 ч), как было описано ранее (Canas-Duarte et al., 2014). Численность оставшихся жизнеспособными персистеров, преимущественно I типа, составляла около 4%, что согласуется с результатами, полученными при селекции персистеров антибиотиком, несколько превышая их.

Влияние факторов гуморальной регуляции на рост культур стафилококков и частоту образования персистеров

Внесение биогенных аминов – адреналина и норадrenalина, вместе с инокулятом влияло на

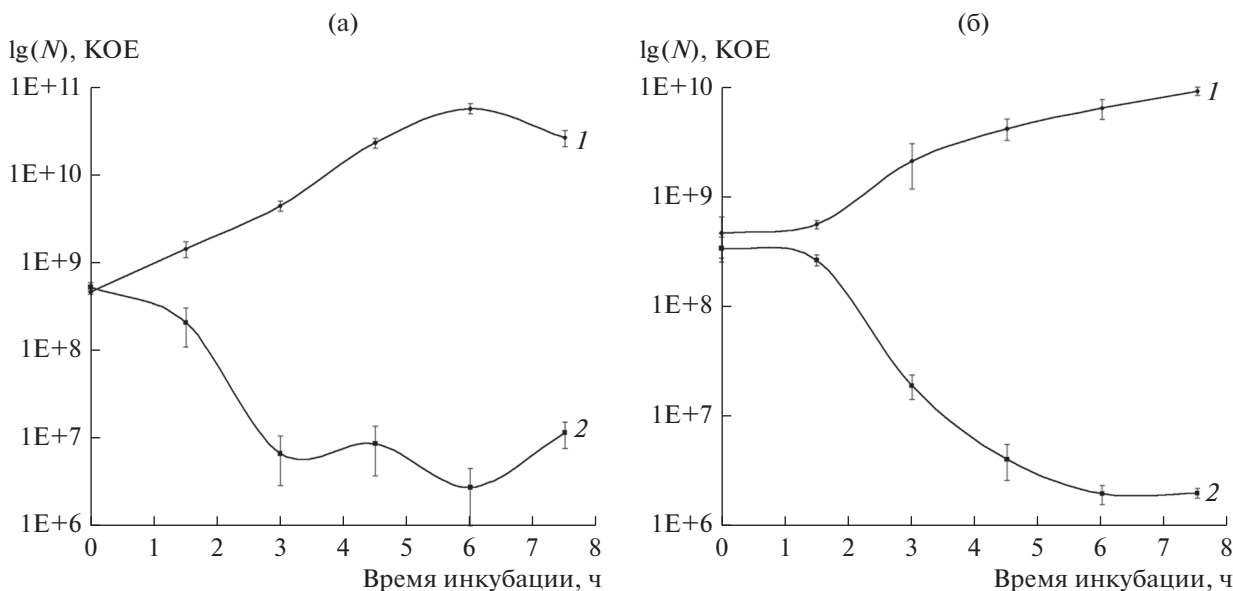


Рис. 1. Кривые отмирания обычных вегетативных клеток с выходом на плато персистеров в культурах *S. epidermidis* (а) и *S. aureus* (б) при селективирующем действии ципрофлоксацина: 1 – контроль; 2 – ципрофлоксацин (10 мкг/мл).

развитие бактериальных культур противоположным образом (рис. 3). Адреналин дозозависимо ингибировал рост *S. epidermidis* (на 20–45% при увеличении его концентрации) по сравнению с контрольным вариантом (100%). При этом доля (%) персистеров, которую определили при их селекции лизирующим раствором относительно общей численности клеток популяции (100%) контрольного варианта, растущего без внесения адреналина, практически не менялась (рис. 3а).

Норадреналин, в отличие от адреналина, слабоположительно влиял на рост *S. epidermidis*, общая численность клеток в стационарных культурах возрастала на 10–20% (рис. 3б). Вместе с тем, внесение норадреналина существенно сказывалось на изменении доли образовавшихся персистеров относительно общей численности клеток (100%) в контрольном варианте – без внесения НА. Доля персистеров возрастала в 2 раза в вариантах с внесением физиологической (ф) и 10-кратной (10ф) доз

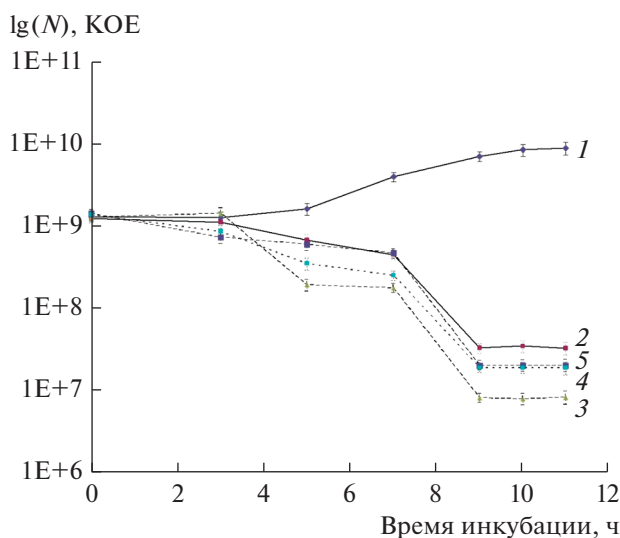


Рис. 2. Кривые отмирания обычных вегетативных клеток с выходом на плато персистеров в культуре *S. aureus* при селективирующем действии лизирующего раствора: 1 – контроль, рост культуры; 2 – контроль, без внесения норадреналина; 3 – внесение физиологической концентрации норадреналина; 4 и 5 – внесение 10- и 100-кратной концентрации норадреналина.

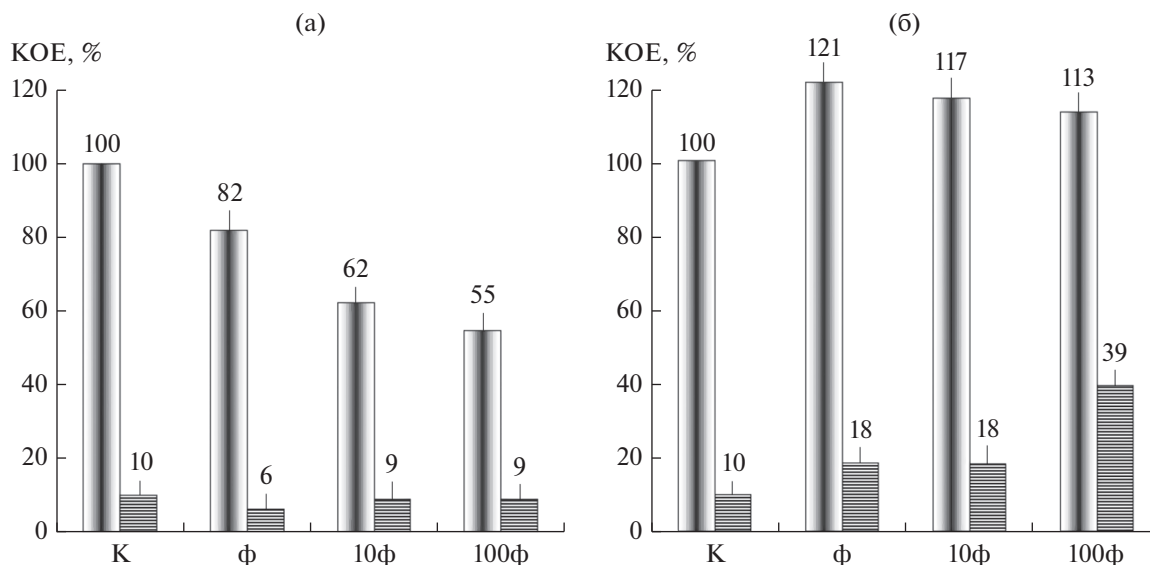


Рис. 3. Зависимость общей численности клеток (левый столбик) и персистеров (правый столбик) в процентах относительно численности клеток популяции в контрольном и опытных вариантах (за 100% принимается общее число клеток и персистеров контроле до и после воздействия лизирующего раствора) от концентрации адреналина (а) и норадреналина (б) в стационарных (24 ч) культурах *S. epidermidis*: ф – физиологическая концентрация; 10ф – 10-кратная; 100ф – 100-кратная.

НА и в 4 раза при внесении НА в 100-кратной (100ф) концентрациях.

Таким образом, развитие бактериальных культур в присутствии физиологической и более высоких (10ф и 100ф) концентраций адреналина обуславливало дозозависимое ингибирование роста культур *S. epidermidis* при практически неизменном количестве образующихся персистеров. Норадреналин действовал противоположным образом, его присутствие во всех испытанных концентрациях практически не сказывалось на росте, но приводило к существенному дозозависимому (но не линейно) увеличению численности персистеров. То есть адреналин практически не влияет на количество персистеров в единице объема среды, тогда как в присутствии норадреналина их количество существенно возрастает. Этот показатель отражает экологическую значимость поддержания достаточной численности персистеров для выживания популяций стафилококков, обитающих на коже и слизистых человека, в условиях резко меняющихся концентраций нейромедиаторов, синтезируемых как организмом хозяина, так и его микробиомом в ответ на внешние стрессорные воздействия.

Другой алгоритм расчета количества персистеров отражает частоту их образования, как их удельную долю (%), относительно общего количества клеток в популяции конкретного варианта (100%) (рис. 4), которое изменяется при росте бактерий в присутствии различных концентраций нейромед-

диаторов, что было показано выше (рис. 3). Внесение как адреналина, так и норадреналина в культуры *S. epidermidis* стимулировало формирование персистеров. Их удельное (%) количество увеличивалось в опытных вариантах при всех концентрациях катехоламинов в нелинейной зависимости (рис. 4а). При этом корреляции между влиянием на рост культур и образованием в них персистеров не было. Если адреналин дозозависимо ингибировал рост культур *S. epidermidis* (рис. 3а), то частота образования персистеров, напротив, возрастала (рис. 4а), увеличиваясь до 300% по сравнению с числом персистеров в контрольной культуре (100%) (рис. 4в). Внесение норадреналина индуцировало незначительную стимуляцию роста популяции (рис. 3б), вызывая при этом увеличение их доли (%) в опытных культурах (рис. 4б), что по сравнению с контрольным вариантом составляло от 190 до 430% (рис. 4г).

Оба катехоламина стимулирующе действовали на частоту образования персистеров в культурах *S. epidermidis*.

Влияние нейроактивных аминов на развитие и образование персистеров в культурах *S. aureus* имело иной характер. Оба нейромедиатора ингибировали образование персистеров, снижая их долю (%) от общей численности клеток в культуре (рис. 5а, 5б). Их относительное содержание (%) от численности персистеров в контрольной культуре (100%) также снижалось дозозависимо при

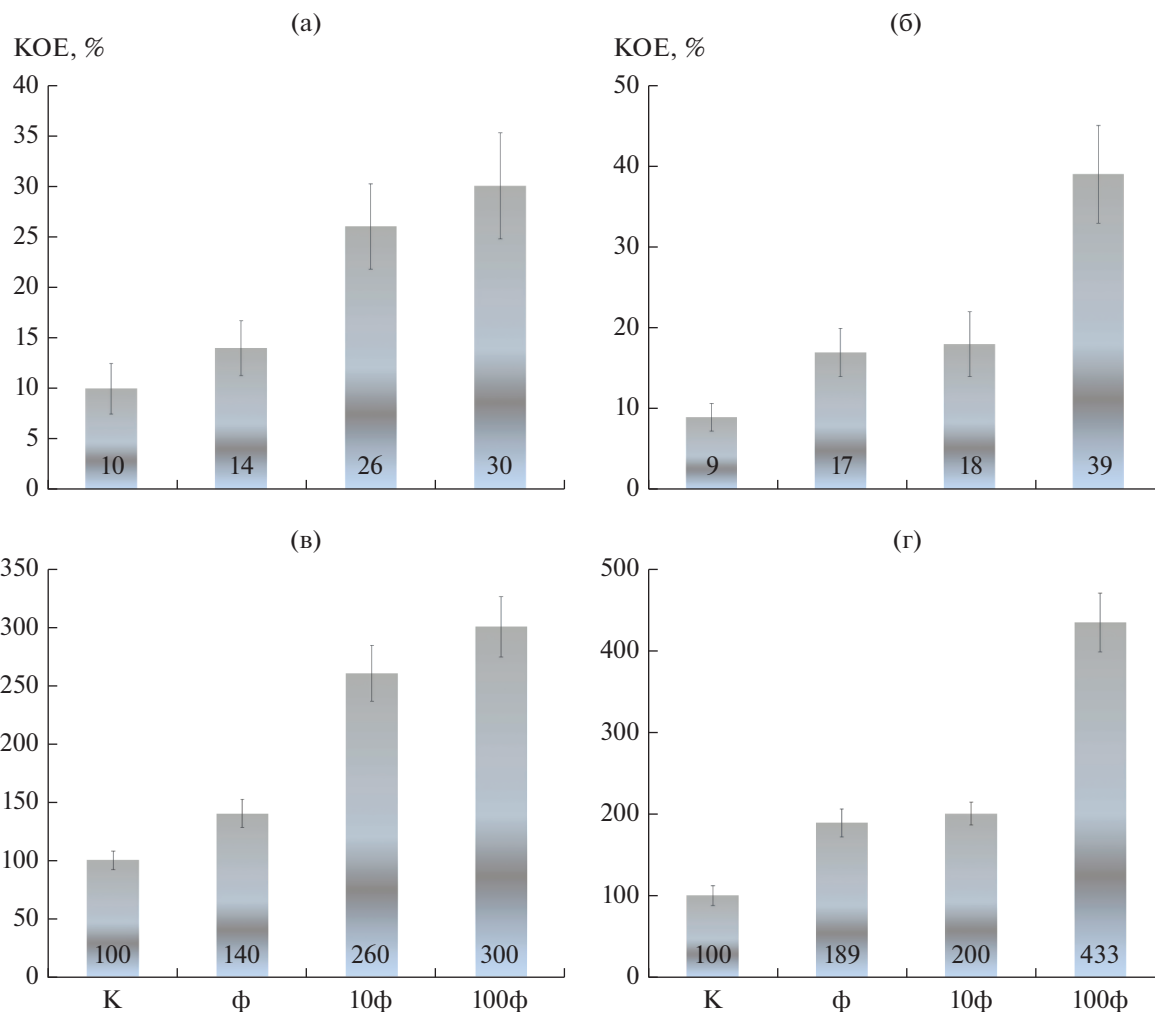


Рис. 4. Численность персистеров (%) в культурах *S. epidermidis*, развивающихся в присутствии адреналина (а, в) или норадреналина (б, г) в концентрациях: ф – физиологическая концентрация; 10ф – 10-кратная; 100ф – 100-кратная. Числами показаны доли (%) персистеров относительно: а, б – общей численности клеток популяции в данном варианте (100%); в, г – относительно численности персистеров в контрольном варианте без внесения катехоламинов (100%).

внесении адреналина (рис. 5в) и дозозависимо при внесении норадреналина (рис. 5г).

Связь эффектов катехоламинов с таксономической принадлежностью модельных бактерий отмечалась ранее. Так, норадреналин и адреналин стимулировали рост *Vibrio parahaemolyticus* и *V. mimicus*, но не *V. vulnificus* и *V. cholerae* (Nakano et al., 2007). Положительное влияние возрастающих концентраций адреналина и норадреналина на частоту образования персистеров в культурах стафилококков – контаминантов кожных покровов человека показано впервые.

Влияние факторов гуморальной регуляции на выживание персистеров в стрессовых условиях

Постановка задачи в этой серии экспериментов была обусловлена частыми колебаниями со-

держания источников питания в/на кожных покровах человека, что влияет не только на развитие популяций бактерий, контаминирующих кожу, но и на их выживание в условиях периодически наступающего голодания. Поэтому было исследовано сохранение жизнеспособности персистеров в условиях голодания (суспензия в физрастворе) без и в присутствии факторов гуморальной регуляции – адреналина, норадреналина и эстрадиола. Модельным объектом были персистеры, изолированные из стационарной культуры *S. epidermidis* при использовании лизирующего раствора, как описано выше, и суспендированные после отмывки в физиологическом растворе (титр КОЕ $\sim 10^8$ кл./мл).

Выживание персистеров при длительном (12 ч) голодании. Длительная инкубация (12 ч) персистеров в условиях голодания (в физиологическом

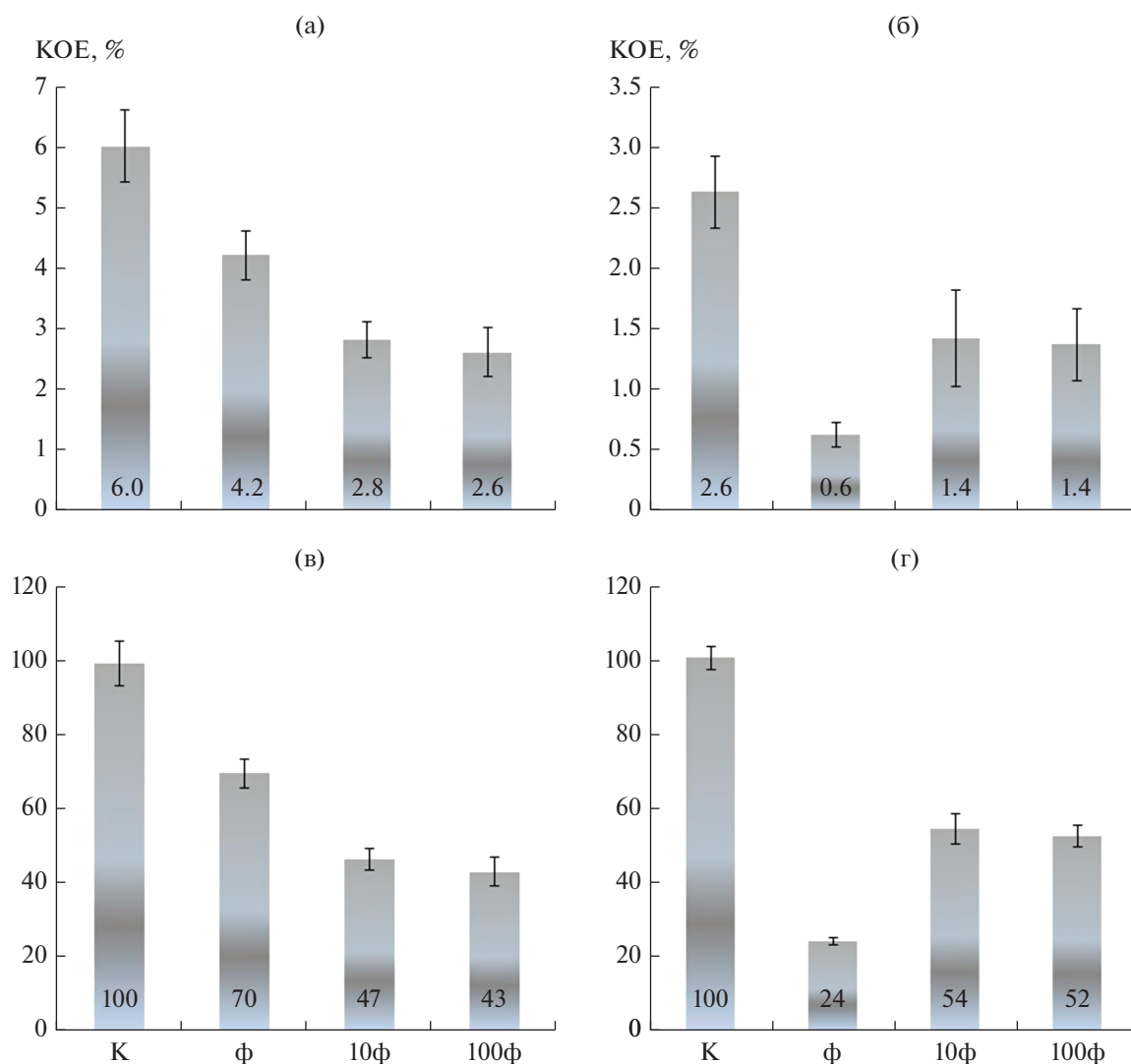


Рис. 5. Численность персистеров (%) в культурах *S. aureus*, развивающихся в присутствии адреналина (а, в) или норадrenalина (б, г) в концентрациях: ф – физиологическая концентрация; 10ф – 10-кратная; 100ф – 100-кратная. Числами показаны доли (%) персистеров относительно: а, б – общей численности клеток в данном варианте (100%); в, г – относительно численности персистеров в контрольном варианте без внесения катехоламинов (100%).

растворе) индуцировала снижение КОЕ на 90% в контрольных вариантах (рис. 6). В опытных вариантах инкубации персистеров в присутствии адреналина и норадrenalина численность КОЕ также снижалась (рис. 6а, 6б), при этом в большей степени в присутствии адреналина (рис. 6а). Иное действие на выживание персистеров в условиях голодания оказывал эстрадиол: в вариантах с 10- и 100-кратной физиологической концентрацией гормона численность КОЕ снизилась только на 30–40% от исходной, тогда как в контрольных вариантах, а также в присутствии физиологической концентрации эстрадиола – снизилась почти на 2 порядка (рис. 6в). Таким образом, снижение КОЕ-образующей способности персистеров в

условиях голодания, во-первых, отражает гетерогенность их субпопуляции по показателю устойчивости к стрессу голодания, во-вторых, на сохранение КОЕ-способности персистеров в условиях голодания нейроактивные амины практически не влияют, тогда как эстрадиол в высоких (2.2 и 22 нМ) концентрациях повышает сохранность КОЕ-образующей способности персистеров в 3–4 раза по сравнению с контролем.

Устойчивость персистеров к стрессу новой полноценной среды. После перенесения голодавших в физрастворе персистеров в свежую среду очень медленное возрастание численности КОЕ в контроле объясняется, во-первых, необходимостью перестройки молекулярно-генетических и фи-

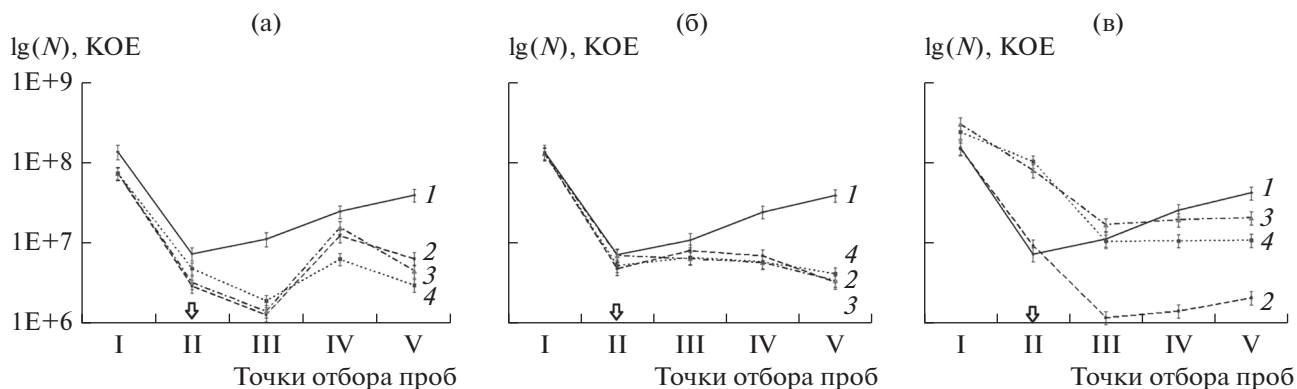


Рис. 6. Динамика изменения численности персистеров (КОЕ/мл) в культурах *S. epidermidis* в условиях 12 ч голодания без гормонов и в присутствии: а – адреналина; б – норадреналина; в – эстрадиола, и последующего развития в свежей полноценной среде. Точки отбора проб для определения титра КОЕ: I – исходная после ресуспендирования персистеров в физрастворе, добавление гормонов в варианты 2–4; II – после 12 ч инкубации в физрастворе с/без гормонов добавление свежей полноценной среды RCM к отмытым персистерам; III, IV и V – через 2, 4 и 6 ч инкубации соответственно, в свежей полноценной среде. Стрелкой показана точка внесения свежей среды RCM. Варианты опыта (номера кривых): 1 – контроль, инкубация персистеров без внесения гормонов; 2 – инкубация в присутствии физиологической концентрации гормона; 3 – 10-кратной физиологической концентрации гормона; 4 – 100-кратной физиологической концентрации гормона.

зиологических программ клетки, и, во-вторых, отмеченной выше гетерогенностью популяции персистеров, совокупно влияющих на характер и длительность лаг-фазы (Balaban et al., 2019; Bacterial Persistence: Methods and Protocols, 2021) (рис. 6а–6в).

В опытных вариантах реакции персистеров на их перенесение в свежую среду различались и зависели от гормона, в присутствии которого они голодали. В варианте голодания в присутствии всех доз норадреналина КОЕ-образующая способность персистеров не восстанавливалась в течение всего срока наблюдений (рис. 6б), что свидетельствует о затяжной лаг-фазе как реакции персистеров на действие норадреналина.

Численность КОЕ в вариантах голодания персистеров в присутствии адреналина после их перенесения в свежую среду продолжала снижаться еще в течение 2 ч, но с меньшей скоростью, а затем резко возрастала с некоторым последующим снижением (рис. 6а). Наименьшие колебания в численности КОЕ были отмечены в вариантах голодания персистеров в присутствии 100-кратной физиологической дозы норадреналина. Если учесть, что время генерации клеток стафилококка составляет не менее 40–60 мин, то резкое увеличение численности КОЕ – на порядок за 2 ч, а также отсутствие лаг-фазы нельзя объяснить ростом и делением клеток персистеров. Скорее мы имеем дело с реверсией персистеров к росту (ресусцитацией) из жизнеспособного некультивируемого состояния, в котором они находились вследствие 1) стресса голодания и очень низкой плотности клеток, что было обнаружено (Pruzzo

et al., 2003) для ординарных вегетативных клеток патогенных бактерий, и 2) последующего стресса богатой свежей среды (Postgate, Hunter, 1963). В этом случае резкое возрастание численности КОЕ через 2 ч инкубации персистеров в свежей среде отражает их ресусцитацию, а не увеличение численности клеток (точки III–IV, рис. 6а). Переходу клеток бактерий в состояние некультивируемости в стрессовых ситуациях посвящено много исследований, однако такое состояние для персистеров в условиях их голодания и реактивации описывается впервые.

Несколько отличающееся действие на сохранение КОЕ-способности персистеров в экстремальных ситуациях оказывал эстрадиол (рис. 6в). В период голодания его высокие концентрации (10ф и 100ф) способствовали сохранению персистерами КОЕ-способности: численность образующих колонии персистеров практически не снижалась, тогда как в контрольном варианте она падала на порядок (точки I–II, рис. 6в). Однако эстрадиол во всех концентрациях не предотвращал стрессорного воздействия свежей богатой среды, которое обуславливало или гибель персистеров, так называемую “смерть, ускоренную субстратом”, или их переход в некультивируемое состояние с падением численности КОЕ на 2 порядка в вариантах с физиологической (ф) концентрацией гормона. В вариантах предварительного голодания персистеров в присутствии высоких концентраций (10ф и 100ф) эстрадиола численность КОЕ-образующих персистеров снижалась на порядок (до уровня контроля) и в последующие 4 ч

наблюдений не изменялась, что, по-видимому, можно рассматривать как лаг-фазу (рис. 6в).

Таким образом, действие факторов гуморальной регуляции на выживание персистеров в условиях 12 ч голодания зависело от концентраций в вариантах воздействия эстрадиолом и не зависело при воздействии катехоламинов. При этом действие гормонов в этот период, безусловно, вызвало физиологические изменения у персистеров, так как реакции персистеров, отмытых от гормонов и затем перенесенных в свежую богатую среду, кардинально различались. Норадреналин дозозависимо препятствовал как реверсии персистеров к росту, так и их переходу в некультивируемое состояние. Адреналин, напротив, способствовал и тому, и другому процессам также дозозависимо. Эстрадиол в высоких концентрациях обуславливал поддержание КОЕ-способности персистеров в условиях голодания, но не предохранял их от стресса новой среды.

Воздействие катехоламинов на развитие бактериальных культур предположительно объясняют их функционированием как аналогов аутоиндукторов QS-системы, которые связываются с рецепторными гистидинкиназами бактерий (Rasco et al., 2008). Катехоламины могут также действовать как плотностные регуляторы, концентрации которых в развивающихся культурах контролируют смену фаз развития бактериальных культур и влияют на цитодифференцировку бактерий (Эль-Регистан и соавт., 2006). Подобное действие катехоламинов объясняет их концентрационное влияние не только на рост культур, но и на частоту образования персистеров, что показано в настоящей работе. Ранее было показано, что максимальные (мкМ) концентрации катехоламинов накапливаются в лаг-фазе роста *E. coli*, что стало основанием для предположения об их функционировании как “триггеров”, активирующих рост и деление клеток в лаг-фазе (Шишов и соавт., 2009). В наших экспериментах отмывка персистеров от катехоламинов с последующим перенесением в богатую среду могла препятствовать их прорастанию.

Эстрадиол является стероидным гормоном, способным физико-химически связываться с гидрофобной липидной стромой цитоплазматической мембраны, обеспечивая ее повышенную стабильность в период голодания. Это объясняет сохранение жизнеспособности персистеров в вариантах с высокими концентрациями гормона (10ф и 100ф) на порядок более высокое, чем в контрольном варианте. После отмывки гормона и перенесения персистеров в богатую среду развивающийся стресс новой среды обуславливает или их частичную гибель, или переход персистеров в некультивируемое состояние. Дозозависи-

мость действия эстрадиола не противоречит этому объяснению.

В настоящей работе получена новая информация о существенном влиянии факторов гуморальной регуляции человека на 1) частоту образования персистеров в культурах стафилококков — контаминантов кожи человека, 2) выживание персистеров в условиях голодания и 3) их реверсию к росту в свежей среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-10071 и, частично, Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н., Ненашева В.А., Козлова А.Н., Грязнова М.Н., Золотарева И.Н. Тирозол — ауторегуляторный фактор D1 *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 1993. Т. 62. № 4. С. 633.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.Н., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 512–528.
- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.
- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 645–659.
- Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Sorokin V.V., El'-Registan G.I., Suzina N.E., Cherdyntseva T.A., Kotova I.B., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 751–763.
- Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 387–397.

- Nikolaev Yu.A.* Extracellular factors of bacterial adaptation to unfavorable environmental conditions // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2004. V. 40. P. 327–336.
- Николаев Ю.А., Панкратов Т.А., Ганнесен А.В., Колганова Т.В., Дёмкина Е.В., Сузина Н.Е., Эль-Регистан Г.И.* Образование и свойства клеток-персистеров и покоящихся клеток бактерий, обитателей кожи человека *Staphylococcus capitis* и *Staphylococcus epidermidis* // *Микробиология.* 2020. Т. 89. С. 432–443.
- Nikolaev Y.A., Pankratov T.A., Gannesen A.V., Demkina E.V., El'-Registan G.I., Kolganova T.V., Suzina N.E.* Formation and properties of persister cells of *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus epidermidis*, bacteria inhabiting human skin // *Microbiology (Moscow).* 2020. V. 89. P. 425–434.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А.* Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы // *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация.* 2020. № 2. С. 18–28.
- Осинов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А.* О химической природе ауторегуляторного фактора D₁ *Pseudomonas carboxydoflava* // *Микробиология.* 1985. Т. 54. С. 186–190.
- Osipov G.A., El-Registan G.I., Svetlichny V.A.* The chemical nature of the autoregulator factor D₁ in *Pseudomonas carboxydoflava* // *Microbiology (Moscow).* 1985. V. 54. P. 186–190.
- Хохлов А.Н., Курнос М.Д., Ванюшин Б.Ф.* Уровень метилирования ДНК и стационарное старение культивируемых клеток // *Известия АН СССР. Сер. биол.* 1988. № 3. С. 476–478.
- Шишов В.А., Кировская Т.А., Кудрин В.С., Олескин А.В.* Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Escherichia coli* K-1 // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45. С. 550–554.
- Shishov V.A., Kirovskaya T.A., Oleskin A.V., Kudrin V.S.* Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of *Escherichia coli* K-12 // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2009. V. 45. P. 494–497.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И.* Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология.* 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Gal'chenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I.* Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // *Microbiology (Moscow).* 2006. V. 75. P. 380–389.
- Bacterial Persistence: Methods and Protocols. 2nd ed. / Eds. Verstraeten N., Michiels J. Springer Science+Business Media, LL, USA, 2021. 292 p.
- Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S.* Bacterial persistence as a phenotypic switch // *Science.* 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melder L., Zinkernagel A.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. P. 441–448.
- Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A.* Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. P. 4597–4607. <https://doi.org/10.1128/IAI.00630-07>
- Bertrand R.L.* Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201. e00697-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Bigger J.W.* Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization // *Lancet.* 1944. V. 244. P. 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Canas-Duarte S.J., Restrepo S., Pedraza J.M.* Novel protocol for persister cells isolation // *PLoS One.* 2014. V. 9. Iss.2. e88660.
- Chang J., Lee R.E., Lee W.* A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells // *Arch. Pharm. Res.* 2020. V. 43. P. 630–638. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01246-x>
- Chen H., Fink G.R.* Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 1150–1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 5048–5052. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401416101>
- Clabaut M., Suet A., Racine P.J. et al.* Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 7133. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86628-x>
- Dawson E., Şimşek E., Kim M.* Observing bacterial persistence at single-cell resolution // *Methods Mol. Biol.* 2021. V. 2357. P. 85–93. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1621-5_6
- Freestone P.P., Haigh R.D., Lyte M.* Catecholamine inotrope resuscitation of antibiotic-damaged staphylococci and its blockade by specific receptor antagonists // *J. Infect. Dis.* 2008. V. 197. P. 1044–1052. <https://doi.org/10.1086/529202>
- Freestone P.P., Lyte M., Neal C.P., Maggs A.F., Haigh R.D., Williams P.H.* The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 6091–6098. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6091-6098.2000>
- Gjertsson I., Lagerquist M.K., Kristiansson E., Carlsten H., Lindholm C.* Estradiol ameliorates arthritis and protects against systemic bone loss in *Staphylococcus aureus* infection in mice // *Arthritis Res. Ther.* 2012. V. 14(2). P. R76. <https://doi.org/10.1186/ar3799>
- Goormaghtigh F., Van Melder L.* Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin

- cin in exponential cultures // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. eaav9462. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9462>
- Hobby G.L., Meyer K., Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin // *Exp. Biol. Med.* 1942. V. 50. P. 281–285. <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773>
- Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shores N., Balaban N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance // *Science.* 2017. V. 355. P. 826–830.
- Lewis K. Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 357–372.
- Lyte M., Freestone P.P., Neal C.P., Olson B.A., Haigh R.D., Bayston R., Williams P.H. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes // *Lancet.* 2003. V. 361. P. 130–135. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12231-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12231-3)
- Lyte M. Microbial endocrinology: an ongoing personal journey // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 874. P. 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0_1
- Lyte M. The effect of stress on microbial growth // *Anim. Health Res. Rev.* 2014. V. 15. P. 172–174. <https://doi.org/10.1017/S146625231400019X>
- Mart'yanov S.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species staphylococcal biofilms // *Microorganisms.* 2021. V. 9. P. 820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040820>
- Nakano M., Takahashi A., Sakai Y., Kawano M., Harada N., Mawatari K., Nakaya Y. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. V. 44. P. 649–653. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02136.x>
- Podlesek Z., Žgur Bertok D. The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785>
- Podlesek Z., Butala M., Šakanović A., Žgur-Bertok D. Antibiotic induced bacterial lysis provides a reservoir of persisters // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2016. V. 109. P. 523–528. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0657-x>
- Postgate J., Hunter J. Acceleration of bacterial death by growth substrates // *Nature.* 1963. V. 198. P. 273. <https://doi.org/10.1038/198273a0>
- Pruzzo C., Tarsi R., Lleò M.M., Signoretto C., Zampini M., Pane L., Colwell R.R., Canepari P. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water // *Environ. Microbiol.* 2003 V. 5. P. 850–858. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00498.x>
- Rasko D.A., Moreira C.G., Li de R., Reading N.C., Ritchie J.M., Waldor M.K., Williams N., Taussig R., Wei S., Roth M., Hughes D.T., Huntley J.F., Fina M.W., Falck J.R., Sperandio V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development // *Science.* 2008. V. 321. P. 1078–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1160354>
- Trueba A.F., Ritz T. Stress, asthma, and respiratory infections: pathways involving airway immunology and microbial endocrinology // *Brain Behav. Immun.* 2013. V. 29. P. 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.012>
- Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. P. 219–251.

Effect of Epinephrine, Norepinephrine, and Estradiol on Persister Formation in the Cultures of Staphylococci from the Human Microbiota and Their Resistance to Starvation and New Medium Stresses

T. A. Pankratov¹, *, Yu. A. Nikolaev¹, A. V. Gannesen¹, and G. I. El'-Registan¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Received January 2, 2022; revised January 20, 2022; accepted January 20, 2022

Abstract—Effects of the human hormones and human microbiota on the growth of symbiotrophic and saprotrophic bacteria is well-known. However, no information is available on the effects of hormones on formation and survival of persister cells. Persistence is a phenotype providing the survival of the population in the presence of biocidal doses of antibiotics. Hence, the aim of this work was to investigate in vitro the effects of the human humoral regulation factors catecholamines (epinephrine (E) and norepinephrine (NE)) and the steroid hormone estradiol on the frequency of persisters (P) formation and their survival under abrupt changes of cultivation conditions – starvation with subsequent transfer of P into a fresh rich medium. This is the first study demonstrating E and NE to impact on the growth of microorganisms that inhabit human skin, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, as well as the frequency of formation of antibiotic-tolerant and lysing agents-resistant persister cells. The effect of E and NE depended on their concentration. New data were obtained on the effect of catecholamines and estradiol on survival of *S. epidermidis* P under drastic changes of incubation conditions. Under conditions of long-term (12 h) starvation in 0.9% NaCl, E and NE in both physiological (ph) concentrations (4.9 and 3.6 nm) and higher ones (10 ph and 100 ph) did not affect P survival; the P amounts in the control and experimental variants decreased by tow orders of magnitude (from 10⁸

to 10^6 CFU/mL). E had no effect on the rich medium stress, and caused the so-called substrate-accelerated cell death, while NE at all the tested concentrations induced transition of P to an uncultured state with subsequent resuscitation (return of the colony-forming ability). Estradiol in the physiological concentration (0.22 nM) had no effect on P survival under starvation, while higher doses (10 ph and 100 ph) reduced starvation stress in P, and the amount of P decreased only 2 times. Higher estradiol concentrations (10 ph and 100 ph) alleviated the rich medium stress. There were obtained the data concerning the effect of human humoral regulation factors on: (1) frequency of P formation in the cultures of *S. aureus* and *S. epidermidis*; (2) P survival under starvation; and (3) their reversion to growth in fresh medium, i.e., under conditions closer to that in the human organism.

Keywords: human microbiota, persisters, human hormones, stress, *Staphylococcus*