

П. В. Пантелеев, С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова*

ВЛИЯНИЕ АРЕНИЦИНОВ И ДРУГИХ β -ШПИЛЕЧНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ НА БИОПЛЁНКИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1

ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова" Российской академии наук, Россия, Москва, e-mail: ovch@ibch.ru

Одной из ключевых проблем современной медицины является распространение штаммов бактерий, обладающих множественной устойчивостью к различным классам антибиотиков. Высокая устойчивость бактерий к действию антибиотических препаратов обусловлена, в частности, их способностью к формированию биоплёнок. В связи с этим необходим поиск новых антимикробных соединений, эффективно действующих на патогенные бактерии независимо от их метаболической активности, физиологических свойств и локализации. Среди таких веществ особый интерес представляют катионные антимикробные пептиды (АМП). Целью данной работы было изучение антибиоплёночной активности ареницина-1 и полученного нами его терапевтически ценного аналога V8R в сравнении с рядом известных β -шпилечных АМП животного происхождения. Показано, что многие β -шпилечные АМП в микромолярном диапазоне концентраций полностью подавляют не только планктонный рост, но и образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, а также убивают бактерии внутри биоплёнок, вызывая при этом их деградацию.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; β -шпилька; ареницин; биоплёнки; *Pseudomonas aeruginosa*.

Подавляющее большинство бактерий существует в природных экосистемах в виде специфически организованных конгломератов — биоплёнок, образование которых представляет сложный и строго регулируемый биологический процесс [1]. Способность бактерий к формированию биоплёнок создает большие трудности для терапии инфекционных заболеваний, так как при этом значительно повышается устойчивость патогенов к действию антибиотических лекарственных средств и факторов иммунной защиты организма-хозяина. Стоит отметить, что биоплёнки могут быть локализованы как в тканях организма-хозяина, так и колонизировать абиотические объекты, например, поверхности изделий медицинского назначения. В связи с этим актуальной задачей современной медицины является разработка препаратов, препятствующих адгезии микроорганизмов и формированию биоплёнок. Кроме того, такие заболевания, как муковисцидоз и остеомиелит, сопровождаются тяжелыми инфекционными осложнениями, терапия которых представляет серьезную проблему вследствие образования биоплёнок, в частности, бактериями *P. aeruginosa* [1]. Таким образом, существует острая необходимость создания препаратов широкого спектра действия для борьбы с уже сформировавшимися зрелыми биоплёнками.

На сегодняшний день известно, что некоторые катионные антимикробные пептиды (АМП), являющиеся компонентами врожденного иммунитета животных и человека, способны действовать на бактерии в составе биоплёнок, а также ингибировать процесс образования данных структур [2]. В то же время практически не изученной в этом отношении остается перспек-

тивная с точки зрения медицинского применения группа АМП, молекулы которых образуют β -шпилечную структуру, стабилизированную дисульфидными связями. Благодаря небольшому размеру, высокой устойчивости к протеолизу, быстрому действию на мембраны патогенных бактерий и широкому спектру антимикробной активности они могут стать основой для разработки новых антибиоплёночных препаратов. Кроме того, амфифильная структура способствует адсорбции β -шпилечных АМП на различных поверхностях без применения сшивающих химических агентов, что упрощает технологию покрытия ими биоматериалов.

Ранее нами были впервые выделены и всесторонне изучены β -шпилечные защитные пептиды из целомоцитов морского кольчатого червя *Arenicola marina*, названные ареницинами [3, 4], а также синтезирован ряд их терапевтически ценных мутантных аналогов [5]. Наибольший интерес с практической точки зрения представляет малотоксичный аналог ареницина-1 с заменой V8R. Целью данной работы было изучение антибиоплёночной активности ареницина-1, его аналога V8R и других β -шпилечных АМП животного происхождения: тахиплезина-1 из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, полифемузина-1 из гемоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*, гомезина из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, танатина из гемолимфы клопа-щитника *Podisus maculiventris*. В качестве соединений сравнения использовали обладающий сходной структурой и механизмом действия β -шпилечный антимикробный пептид NZ17000, запатентованный компанией Adenium Biotech (Дания) как средство для борьбы с грамотрицательными бактериями с

множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [6], и антибиотик последней линии полимиксин В.

Экспериментальная химическая часть

Получение рекомбинантных пептидов

В работе использован коммерчески доступный антибиотик сульфат полимиксина В (Applichem). Все использованные в работе АМП получены методом гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3) в составе гибридных белков, включающих аминокислотные последовательности из 8 остатков гистидина и белка-носителя — тиоредоксина А. Общая для всех АМП схема сборки плазмидных конструкций описана в [4, 5]. Между нуклеотидными последовательностями, кодирующими белок-носитель и целевой пептид, в генно-инженерных конструкциях введен метиониновый кодон ATG, что позволило получать рекомбинантные пептиды без дополнительных *N*-концевых аминокислотных остатков при реакции расщепления гибридного белка бромцианом в кислой среде.

Штаммы-продуценты АМП получали химической трансформацией клеток *E. coli* BL21 (DE3) соответствующими плазидами. Инокулят выращивали в 50 мл пробирках, содержащих 10 мл жидкой среды LB (Lysogeny broth) и 100 мкг/мл ампициллина, в течение 18 ч при 37 °С на термостатируемой качалке при интенсивном перемешивании. Культуру засеивали в жидкую питательную среду LB, содержащую 0,02 М глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина, 1 мМ MgSO₄, при этом начальная OD₆₀₀ составляла 0,05. Индукцию биосинтеза гибридного белка осуществляли путём добавления изопропилтио-β-*D*-галактопиранозида (IPTG) к культуре клеток с оптической плотностью 1,0 до конечной концентрации 0,2 мМ. Культуру выращивали в течение 5 ч при 32 °С и перемешивании со скоростью 220 об/мин. После экспрессии гибридного белка клеточную массу отделяли центрифугированием, ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (рН 7,8) с добавлением 6 М гуанидина гидрохлорида и 20 мМ имидазола при помощи стеклянного гомогенизатора Поттера. Далее суспензию клеток переносили в 50 мл пробирки и подвергали нескольким циклам (5 · 1 мин) ультразвукового лизиса с помощью дезинтергатора (MSE Soniprep), чередуя их со стадиями охлаждения при 4 °С. Лизат клеток центрифугировали при 25000 g в течение 30 мин. Очистку гибридного белка, содержащего в качестве аффинной метки октагистидиновую последовательность, осуществляли с помощью металлохелатной хроматографии на препаративной колонке с Ni-NTA агарозой (Qiagen) в денатурирующих условиях. Элюцию целевого гибридного белка проводили повышением концентрации имидазола в буферном растворе до 0,5 М. Процесс контролировали по изменению оптического поглощения раствора при длине волны 280 нм. К полученной с помощью металлохелатной хроматографии фракции, содержащей белок, добавляли концентрированную соляную кислоту до

рН 1,0 и бромциан (1 г бромциана на 1 г белка), после чего выдерживали при 25 °С в защищенном от света месте в течение 18 ч. Для предотвращения нежелательной фрагментации полипептидной цепи остатки метионина в структуре тиоредоксина А (Met37) и танина (Met21) были заменены остатками лейцина — аминокислоты, близкой к метионину по конформации и гидрофобности. Реакцию останавливали добавлением пятикратного объема деионизированной воды, после чего упаривали образцы на вакуумной центрифуге до исходного объема раствора и доводили раствором NaOH до нейтральных значений рН. Финальную стадию очистки пептидов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ (Dr. Maisch GmbH) в системе буферных растворов, содержащих воду, ацетонитрил и 0,1 % ТФУ. Разделение проводили в градиенте от 5 до 80 % ацетонитрила. Превращение *N*-концевого остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту в структуре гомезина осуществляли инкубацией водного раствора пептида в течение 48 ч при 25 °С и рН 1,0 с последующей очисткой путём ОФ-ВЭЖХ. Гомогенность рекомбинантных АМП и корректность замыкания дисульфидных связей в их структуре были подтверждены методами ОФ-ВЭЖХ и времяпролётной масс-спектрометрии МАЛДИ. Экспериментальные значения *m/z* для всех АМП соответствовали расчётным моноизотопным массам протонированных молекулярных ионов [M + H]⁺ (табл. 1).

Экспериментальная биологическая часть

Оценку противомикробной активности, а также способности соединений влиять на формирование биоплёнки проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде LB. В стерильных 96-луночных планшетах из полистирола или полипропилена (Eppendorf) готовили исследуемые препараты с помощью двукратных серийных разведений в стерильной воде или 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) в объеме 50 мкл. БСА использовали для снижения неспецифического связывания амфифильных пептидов с поверхностью планшетов или компонентами среды. Далее в лунки планшета вносили культуру бактерий *P. aeruginosa* PAO1, находящуюся в стационарной фазе роста (после 24 ч инкубации в жидкой среде LB), по 4 · 10⁵ КОЕ на лунку в 50 мкл среды LB. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 32 °С и перемешивании со скоростью 120 об/мин, обеспечивая формирование биоплёнки преимущественно на стенках лунки. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм как минимальные концентрации веществ, при которых планктонный рост микроорганизмов подавляется более чем на 90 %. После удаления среды и промывки лунок дистиллированной водой проводили окрашивание образованных биоплёнок 0,1 % водным раствором красителя кристаллического фиолетового (CV)

(Sigma) в течение 40 мин при 25 °С. Далее жидкость удаляли, лунки тщательно промывали водой и добавляли по 150 мкл 96 % этанола для экстракции красителя из биоплёнок. Через 40 мин экстракты переносили в новый 96-луночный планшет и измеряли абсорбцию раствора при 620 нм. По интенсивности окраски раствора судили об уровне образования биоплёнки и её относительной массе по сравнению с образцами, не содержащими противомикробного агента.

Влияние противомикробных соединений на сформированные биоплёнки оценивали следующим образом. Из лунок 96-луночного планшета со сформированными за 18 ч биоплёнками удаляли планктонную культуру, промывали лунки водой, добавляли 100 мкл среды LB/2, содержащей противомикробный агент и 0,05 % БСА, после чего инкубировали в течение 90 мин при 37 °С и перемешивании со скоростью 180 об/мин. Изменение массы биоплёнок контролировали с помощью описанной выше методики окрашивания 0,1 % раствором CV. Оценку жизнеспособности бактерий в составе биоплёнок контролировали с помощью МТТ-теста. После инкубации с противомикробным агентом лунки промывали дистиллированной водой, добавляли по 150 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Sigma) с концентрацией 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), инкубировали в течение 4 ч при 37 °С, далее среду удаляли. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 150 мкл смеси этанол — ДМСО (1:1) в течение 40 мин. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм. Выживаемость бактерий рассчитывали в процентах относительно образцов, не содержащих противомикробного агента.

Все данные были получены не менее чем в 2 независимых экспериментах в 4 повторностях и приведены с учетом стандартного отклонения. Статистиче-

скую обработку данных проводили при помощи программы GraphPad PRISM 6.0.

Результаты и их обсуждение

Антибактериальную активность полученных АМП и конвенционального антибиотика полимиксина В тестировали в отношении планктонной культуры *P. aeruginosa* PAO1, находящейся в стационарной фазе роста. Известно, что амфифильные АМП могут адсорбироваться на поверхности пластика, поэтому эксперимент проводили как в отсутствие, так и в присутствии в среде БСА, способного сводить к минимуму данный эффект (табл. 2).

Учитывая проявленную АМП склонность к неспецифической адсорбции (разница МИК 2 – 8 раз), оценку влияния этих соединений на формирование биоплёнок проводили как в отсутствие, так и в присутствии БСА. В контрольных экспериментах было показано, что присутствие БСА не влияет на количество биомассы биоплёнки, однако кардинальным образом меняет картину действия АМП (рис. 1). За исключением танатина, все соединения продемонстрировали высокую активность в отношении *P. aeruginosa* PAO1, причём в концентрациях, подавляющих планктонный рост бактерий (МИК), как правило, практически полностью ингибируется процесс формирования биоплёнки, что может свидетельствовать о высокой эффективности антибактериального действия. Отличительной особенностью гомезина являлась индукция образования биоплёнок до 40 % от контрольного значения при действии в высокой концентрации (100 мкМ). Ранее для данного АМП был показан аналогичный эффект в отношении биоплёнок, формируемых грамотрицательными бактериями *Xylella fastidiosa* [7]. Результаты, показанные контрольным антибиотиком полимиксином В, также соответствуют описанным ранее в литературе [8]. Танатин в экспериментах не проявил существ-

Таблица 1

Аминокислотные последовательности, молекулярные массы и выход рекомбинантных β-шипечных АМП

Пептид	Аминокислотная последовательность ¹	Молекулярная масса, Да		Выход ⁴ , мг/л культуры
		расч. ²	эсп. ³	
NZ17000	GFC ¹ WYVC ¹¹ VYRNGV ¹¹ RVC ¹¹ YRRC ¹ N	2612,17	2612,91	5,2
Ареницин-1	RWC ¹ VYAYV ¹¹ RVRG ¹¹ VLRV ¹¹ YRRC ¹ W	2757,46	2757,58	4,5
Ареницин V8R	RWC ¹ VYAY ¹¹ RRVRG ¹¹ VLRV ¹¹ YRRC ¹ W	2814,49	2814,86	9,5
Тахиплезин-1	KWC ¹ FRVC ¹¹ YRGIC ¹¹ YRRC ¹ R	2264,08	2263,73	10,5
Полифемезин-1	RRWC ¹ FRVC ¹¹ YRGFC ¹¹ YRKC ¹ R	2454,16	2453,82	8,5
Гомезин ⁵	ZC ¹ RRLC ¹¹ YKQRC ¹¹ VTYC ¹ RGR	2271,06	2270,81	9,2
Танатин ⁶	GSKKPVPIIYC ¹ NRRTGKC ¹ QRL	2415,32	2415,36	12,5

¹ Остатки цистеина, участвующие в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей, отмечены соответствующими цифрами.

² Расчётные значения моноизотопных масс протонированных молекулярных ионов.

³ Экспериментальные значения *m/z*, установленные методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

⁴ Концентрации водных растворов АМП определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с использованием соответствующих расчётных коэффициентов экстинкции.

⁵ В структуре гомезина отмечен остаток пироглутаминовой кислоты (Z).

⁶ Рекомбинантный аналог танатина с аминокислотной заменой M21L.

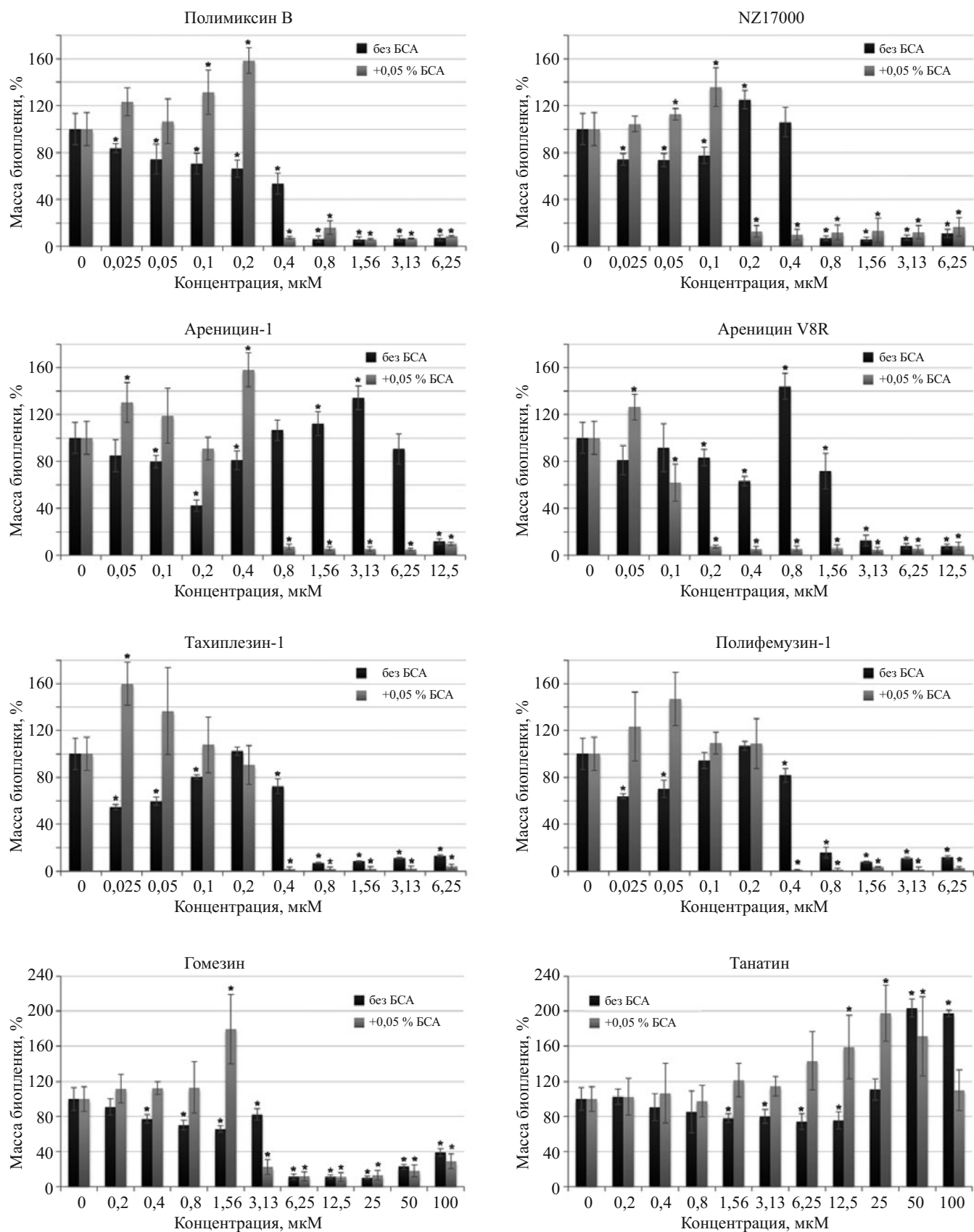


Рис. 1. Влияние β -спилочных АМП и полимиксина В на формирование биоплёнок *P. aeruginosa* PAO1. Результаты приведены в процентах относительно образцов, не содержащих противомикробного вещества, в виде средних значений с учетом стандартного отклонения (* достоверные различия с контролем, $p < 0,05$). Оценку относительной массы биоплёнки проводили с помощью окрашивания 0,1 % CV. В качестве растворителя при серийных разведениях противомикробных соединений были использованы стерильная вода (черные столбцы) или раствор БСА в воде (серые столбцы).

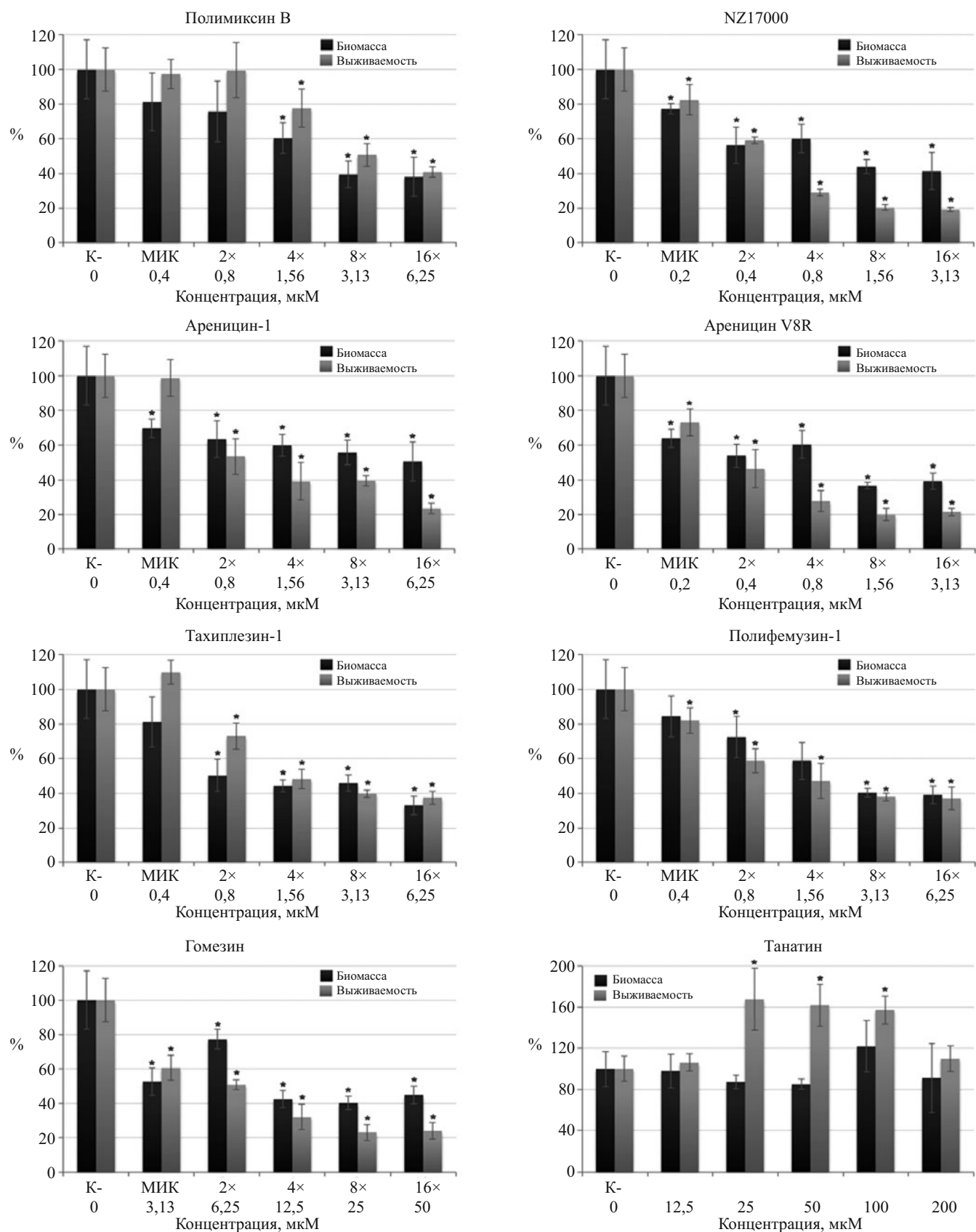


Рис. 2. Влияние β -спилочных АМП и полимиксина В на сформированные биоплёнки *P. aeruginosa* PAO1. Результаты приведены в процентах относительно образцов, не содержащих противомикробного вещества, в виде средних значений с учётом стандартного отклонения (* достоверные различия с контролем, $p < 0,05$). Изменение массы биоплёнок (чёрные столбцы) контролировали методом окрашивания 0,1 % CV. Изменение выживаемости бактерий в составе биоплёнок (серые столбцы) контролировали с помощью МТТ-теста. В эксперименте использовали концентрации действующих веществ, кратные минимальным концентрациям, подавляющим рост планктонной культуры в присутствии БСА (см. табл. 2).

венных противомикробных и антибиоплёночных свойств. Более того, при концентрациях выше 50 мкМ, напротив, наблюдалась выраженная стимуляция роста биоплёнок. Важно отметить, что в большинстве случаев при действии АМП в концентрациях 1/2 МИК стимуляция образования биоплёнок сопровождалась некоторым снижением (в 1,5–2 раза) планктонного роста по сравнению с контролем независимо от присутствия БСА (данные не приведены).

Наблюдаемая стимуляция роста биоплёнок в близких субингибирующих концентрациях как в присутствии, так и в отсутствие БСА, была показана ранее для антибиотиков группы аминогликозидов [9]. Можно предположить, что АМП активируют сигнальные пути и инициируют экспрессию генов, способствующих формированию биоплёнок. Продемонстрированные эффекты сохранялись при замене полистироловых 96-луночных планшетов планшетами из полипропилена — материала, который широко используется для изготовления эндопротезов в хирургии. Интересно, что в отсутствие БСА пептиды в низких концентрациях способны, наоборот, ингибировать рост биоплёнок вплоть до 50 %. По-видимому, в концентрации 1/8 МИК и ниже пептиды уже не вызывают выраженной стимуляции роста биоплёнок, однако препятствуют адгезии бактерий на поверхности планшета. Данный эффект может представлять интерес с точки зрения создания антибактериальных покрытий для биоматериалов и изделий медицинского назначения.

На следующем этапе оценивалась способность АМП воздействовать на заранее сформировавшуюся биоплёнку *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 2), причём использовались повышенные концентрации противомикробных соединений (\geq МИК), что обеспечивало быстрое уничтожение открепляющихся (планктонных) бактерий. В ходе эксперимента использовали от-

носительно короткое время действия пептида (90 мин), поскольку оно сопоставимо со временем полужизни β -шипилечных АМП в сыворотке крови [10]. За исключением танатина, все исследуемые соединения продемонстрировали способность убивать бактерии внутри биоплёнок, в той или иной степени вызывая деградацию внеклеточного матрикса (от 20 до 60 %). Известно, что в отличие от остальных АМП, нарушающих целостность бактериальных мембран, танатин действует путем агглютинации клеток [11]. Несмотря на тот факт, что танатин, как и другие β -шипилечные АМП, способен эффективно связывать липополисахарид [6], по-видимому, это свойство не является достаточным для проявления пептидом как противомикробной, так и антибиоплёночной активности в отношении *P. aeruginosa* PAO1. Наличие остаточной жизнеспособности бактерий (около 20 %) даже при использовании высоких концентраций наиболее активных АМП — аналога ареницина V8R и NZ17000 — может объясняться ограничением диффузии пептидов в структуру биоплёнки. Показано, что данные пептиды в концентрации 0,8 мкМ вызывают гибель ~70 % бактерий в биоплёнках, в то время как полимиксин В — не более 25 %. Кроме того, по сравнению с полимиксином В β -шипилечные АМП обладают значительно меньшей острой токсичностью *in vivo* [12], что является еще одним аргументом в пользу перспективности их медицинского применения.

Полученные данные позволяют рассматривать β -шипилечные АМП, в частности ареницин и его аналоги, в качестве прототипов новых антибиоплёночных средств, использование которых помогло бы уменьшить риск селекции устойчивых форм бактерий. Однако в связи с тем, что АМП в субингибирующих концентрациях могут стимулировать рост биоплёнок, особое внимание должно быть уделено подбору оптимальных терапевтических концентраций. Актуальной задачей дальнейших исследований станет углубленное изучение механизма действия β -шипилечных АМП на биоплёнки патогенных бактерий, в том числе обладающих МЛЮ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01036).

Таблица 2
Антибактериальная активность веществ в отношении планктонной культуры *P. aeruginosa* PAO1, находящейся в стационарной фазе роста

Противомикробный агент	МИК*, мкМ	
	без БСА	+ 0,05 % БСА
Полимиксин В	0,4	0,4
NZ17000	0,8	0,2
Ареницин-1	6,25	0,8
Ареницин V8R	1,56	0,2
Тахиплезин-1	0,8	0,4
Полифемезин-1	0,8	0,4
Гомезин	6,25	3,13
Танатин	> 200	> 200

* Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм как минимальные концентрации веществ, при которых рост микроорганизмов подавляется более чем на 90 %. Эксперименты проводили трижды в четырехкратной повторности, причём итоговое значение МИК рассчитывали как медиану полученных значений.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, *Nature*, **2(2)**, 95 – 108 (2004).
2. C. de la Fuente-Nunez, F. Reffuveille, E. F. Haney, et al., *PLoS Pathog.*, **10(5)**, e1004152 (2014).
3. T. V. Ovchinnikova, G. M. Aleshina, S. V. Balandin, et al., *FEBS Let.*, **577(1–2)**, 209 – 214 (2004).
4. T. V. Ovchinnikova, Z. O. Shenkarev, K. D. Nadezhdin, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360(1)**, 156 – 162 (2007).
5. P. V. Panteleev, I. A. Bolosov, S. V. Balandin, and T. V. Ovchinnikova, *J. Pept. Sci.*, **21(2)**, 105 – 113 (2015).
6. P. V. Panteleev, I. A. Bolosov, S. V. Balandin, and T. V. Ovchinnikova, *Acta Naturae*, **7(1)**, 37 – 47 (2015).
7. A. C. Fogaca, P. A. Zaini, N. A. Wulff, et al., *FEMS Microbiol. Let.*, **306(2)**, 152 – 159 (2010).
8. M. Berditsch, T. Jager, N. Stremmel, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59(9)**, 5288 – 5296 (2015).

9. L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, et al., *Nature*, **436**(7054), 1171 – 1175 (2005).
10. P. V. Panteleev, I. A. Bolosov, and T. V. Ovchinnikova, *J. Pept. Sci.*, **22**(2), 82 – 91 (2016).
11. P. Fehlbaum, P. Bulet, S. Chernysh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**(3), 1221 – 1225 (1996).
12. И. А. Дьяченко, А. Н. Мурашев, З. А. Якименко и др., *Токсикологический вестник*, **112**(1), 40 – 43 (2012).

Поступила 29.08.16

EFFECT OF ARENICINS AND OTHER β -HAIRPIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 BIOFILMS

P. V. Panteleev, S. V. Balandin, and T. V. Ovchinnikova

Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia.

* e-mail: ovch@ibch.ru

Wide spread of multidrug resistant bacteria is among the main medical problems nowadays. The ability of pathogens to form biofilms is an important factor of their drug resistance. It is important to seek for new antimicrobial substances possessing high efficacy against pathogenic bacteria with different metabolic activities, physiological properties, and localization types. Cationic antimicrobial peptides (AMPs) are good candidates for such new antibiotic agents. The aim of this study was to investigate the anti-biofilm activity of arenicin-1, its therapeutically valuable analog V8R developed previously, and several other β -hairpin AMPs of animal origin. A number of β -hairpin AMPs at micromolar concentrations were found to inhibit both the planktonic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its biofilm formation as well as to kill bacteria in biofilms and cause degradation of their structure.

Keywords: antimicrobial peptides; β -hairpin; arenicin; biofilms; *Pseudomonas aeruginosa*.