



Алгоритм разработки комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы

В. А. Филатов✉, О. Ю. Куляк, Е. И. Каленикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1

✉ Контактное лицо: Филатов Виктор Андреевич. E-mail: filatovvictor097@gmail.com

ORCID: В. А. Филатов – <https://orcid.org/0000-0001-7179-8062>; О. Ю. Куляк – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>; Е. И. Каленикова – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>.

Статья поступила: 28.02.2024

Статья принята в печать: 00.05.2024

Статья опубликована: 17.05.2024

Резюме

Введение. Несмотря на доказанную клиническую эффективность противогрибковых и противовоспалительных лекарственных препаратов для профилактики и лечения себорейного дерматита, актуален поиск новых мишеней и разработка новых субстанций с благоприятным действием на микрофлору кожи головы, низким риском развития резистентности бактерий и побочных эффектов.

Цель. Поэтапная разработка антимикробной комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения: от научного поиска перспективных субстанций, анализа их состава методом ГХ-МС, оценки *in silico* степени сродства отдельных компонентов к патогенетическим мишеням, выбора оптимального состава комбинированной субстанции по результатам тестирования *in vitro* антимикробного действия до создания препарата на ее основе в форме лекарственного шампуня для терапии себорейного дерматита.

Материалы и методы. Объекты исследования: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол, (-)- α -бисаболол и комбинированная субстанция на их основе в массовом соотношении 1:1:1. Методы: молекулярный докинг (AutoDock, версия 4.2), прогноз фармакологической активности (Phyto4Health), ТСХ, ГХ-МС, оценка антимикробной активности *in vitro*.

Результаты и обсуждение. По результатам литературного поиска были выбраны 3 перспективных вещества для разработки комбинированной субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и (-)- α -бисаболол. На основании молекулярного докинга предсказано таргетированное действие компонентов эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола на домены в составе ABC-транспортёров мембраны микроорганизмов, участвующих в патогенезе себорейного дерматита, и обоснована возможность их применения для терапии. Разработана комбинированная субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола в массовом соотношении 1:1:1. Проведена оценка подлинности субстанции методами ТСХ и ГХ-МС, и в ее составе количественно выявлены 15 терпенов с преобладанием терпинен-4-ола (16,98%), 1,8-цинеола (25,63%) и α -(-)-бисаболола (27,67%). Установлена синергетическая и таргетированная антимикробная активность субстанции в отношении *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Malassezia furfur* в сравнении с бензалкония хлоридом, кетоконазолом и климбазолом. На основе изученной субстанции разработан состав нового лекарственного шампуня, обладающего выраженным противогрибковым эффектом (более 99%) в отношении *M. furfur* без видимого подавления нормальной микрофлоры. Для новой субстанции растительного происхождения и лекарственного шампуня оценены показатели качества в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи.

Заключение. Разработана субстанция растительного происхождения, обладающая синергетической и таргетированной антимикробной активностью и представляющая интерес для дальнейшего изучения в качестве лекарственного средства и активной фармацевтической субстанции новых продуктов для лечения себорейного дерматита.

Ключевые слова: разработка, себорейный дерматит, чайное дерево, 1,8-цинеол, бисаболол, антимикробное действие, лекарственный шампунь, докинг, фармацевтический анализ, ТСХ, ГХ-МС

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. А. Филатов отвечал за планирование дизайна экспериментов, их проведение, обработку, интерпретацию полученных данных и формулирование выводов, разработку состава лекарственного шампуня. О. Ю. Куляк, Е. И. Каленикова редактировали и анализировали материалы, оказывали консультационную помощь в проведении экспериментов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, написании и оформлении статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и ЦКП НО «Арктика» ФГАУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова» при административной и финансовой поддержке ООО «Сплат Глобал» и Московского филиала АО «Скайлаб».

Для цитирования: Филатов В. А., Куляк О. Ю., Каленикова Е. И. Алгоритм разработки комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1772>

Algorithm for the development of a multicomponent pharmaceutical substance of plant origin with antimicrobial action: from science search to dosage form

Viktor A. Filatov✉, Olesya Yu. Kulyak, Elena I. Kalenikova

Lomonosov Moscow State University. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

✉ Corresponding author: Viktor A. Filatov. E-mail: filatovviktor097@gmail.com

ORCID: Viktor A. Filatov – <https://orcid.org/0000-0001-7179-8062>; Olesya Yu. Kulyak – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>; Elena I. Kalenikova – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>.

Received: 28.02.2024 Accepted: 00.05.2024 Published: 17.05.2024

Abstract

Introduction. Despite the proven clinical efficacy of antifungal and anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of seborrheic dermatitis, the search for new targets and the development of new substances with a beneficial effect on the scalp microflora, with a low risk of antimicrobial resistance and adverse effects, are relevant.

Aim. Development of the antimicrobial multicomponent pharmaceutical substance of plant origin in stages: from a literature search for promising substances, analysis of their composition by GC-MS, *in silico* evaluation of the affinity of individual components to pathogenetic targets, selection of the optimal composition of a multicomponent substance based on the results of *in vitro* research of antimicrobial action and the making of a medical dosage form based on it – a medicinal shampoo for the treatment of seborrheic dermatitis.

Materials and methods. Objects of research: tea tree essential oil, 1,8-cineole, (-)- α -bisabolol and the multicomponent substance based on them. Methods: molecular docking (AutoDock version 4.2), prediction of pharmacological activity (Phyto4Health), TLC, GC-MS, study of antimicrobial activity *in vitro*.

Results and discussion. Based on the results of a literature search, 3 promising substances were selected for the development of a multicomponent plant-based substance: tea tree essential oil, 1,8-cineole and (-)- α -bisabolol. Molecular docking predicted the targeted activity of the phytochemicals of tea tree essential oil, 1,8-cineole and α -(-)-bisabolol on the domains of ABC-transporters of microorganisms involved in the pathogenesis of seborrheic dermatitis and justified the possibility of use for therapy. The multicomponent substance has been developed based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and α -(-)-bisabolol in a mass ratio of 1:1:1. The qualitative composition of the substance was assessed by TLC and GC-MS methods, and 15 terpenes were quantitatively identified in its composition with a predominance of terpinen-4-ol (16.98 %), 1,8-cineole (25.63 %) and α -(-)-bisabolol (27.67 %). The synergistic antimicrobial activity of the substance has been established against *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* and *M. furfur* in comparison with benzalkonium chloride, ketoconazole and climbazole. The composition of a new medical shampoo based on the investigated substance has been developed, which has a pronounced antifungal effect (more than 99.0 %) against *M. furfur* without visible suppression of normal microflora. For the novel substance of plant origin and medical shampoo, quality parameters were assessed in accordance with the Russian Pharmacopoeia of XIV edition.

Conclusion. A substance of plant origin with synergistic and targeted antimicrobial activity has been developed. It has an interest for further study as a drug and API for new products for the treatment of seborrheic dermatitis.

Keywords: seborrheic dermatitis, tea tree oil, eucalyptol, bisabolol, antimicrobial activity, medical shampoo, docking, TLC, GC-MS

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Viktor A. Filatov was responsible for planning the design of experiments, conducting them, processing, interpreting the obtained data and formulating conclusions, developing the composition of medical shampoo. Olesya Yu. Kulyak and Elena I. Kalenikova edited and analyzed the materials, provided consulting assistance in conducting experiments. All authors participated in the discussion of the results, writing and design of the original article.

Funding. The results of the research were obtained using the equipment of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU), Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Kazan (Volga Region) Federal University" and the Central Public Educational Institution "Arctic" of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Northern (Arctic) Federal University named M.V. Lomonosov" with the administrative and financial support of LLC "Splat Global" and the Moscow branch of JSC "Skylab".

For citation: Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. Algorithm for the development of a multicomponent pharmaceutical substance of plant origin with antimicrobial action: from science search to dosage form. *Drug development & registration*. 2024;13(2). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1772>

ВВЕДЕНИЕ

Новая национальная стратегия развития фармацевтического рынка «Фарма-2030» на ближайшие десять лет предусматривает разработку и вывод на рынок новых лекарственных препаратов (ЛП). Для ускорения разработки инновационных ЛП наи-

более перспективен комплексный подход, включающий этапы от литературного поиска перспективных субстанций, оценки *in silico* степени их сродства к патогенетическим мишеням, прогнозирования и тестирования *in vitro* фармакологической активности до создания ЛП [1–2]. Современные методы био-

информатики и медицинской химии позволяют оценить взаимосвязь структуры биологически активных соединений и их активности, предсказать фармакологические эффекты и оптимизировать процесс разработки новых субстанций [3]. Разработка новых субстанций растительного происхождения с антимикробным эффектом позволит расширить номенклатуру лекарственных средств (ЛС) для лечения дерматологических заболеваний.

Дерматологические заболевания кожи головы и волос в значительной мере влияют на качество жизни людей. По оценкам эпидемиологов, себорейный дерматит (СД) и его более легкая форма, перхоть, распространены у 50 % взрослой популяции и у 42 % новорожденных в отдельных странах мира [4–5]. С точки зрения патофизиологии СД – это хроническое рецидивирующее заболевание кожных покровов с изменением качественного состава микрофлоры, увеличением секреции кожного себума, нарушением эпидермального барьера и активным воспалением¹ [6]. Детальный патогенез СД остается **неясным** [7].

Высокая распространенность СД и наличие большого перечня ассоциированных заболеваний подчеркивает актуальность поиска новых ЛС для профилактики и лечения данной патологии. Согласно клиническим рекомендациям [8] обычно используется комплексная терапия фунгицидными, противовоспалительными и глюкокортикоидными препаратами для наружного применения. Несмотря на их значительный терапевтический эффект и уровни убедительности рекомендаций А-В, такой подход на практике ведет к нарушению биоразнообразия микрофлоры кожи головы [9], формированию резистентности микроорганизмов к назначенной фунгицидной терапии [10] и зачастую к побочным эффектам при длительном применении ЛП [11]. ЛС для терапии СД включают как монокомпонентные, так и многокомпонентные препараты. При этом среди присутствующих на рынке РФ ЛП для лечения СД из различных фармакологических групп невозможно выделить ЛС с оптимальным соотношением безопасности и эффективности.

В последние **годы в условиях поиска средств для лечения** дерматологических заболеваний человека особое внимание привлекают новые субстанции растительного происхождения и лекарственные растительные препараты [12–13], применение которых характеризуется многоцелевым действием на патогенетические мишени СД, приемлемой дерматологической совместимостью и меньшим риском развития антимикробной резистентности [14–16].

¹ Дерматит себорейный (2020). Клинические рекомендации. Доступно по: https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/dermatit-seborejnyj_13921/ Ссылка активна на 08.02.2024.

Несмотря на отсутствие в клинических рекомендациях РФ от 2020 года показаний к применению субстанций из растительного сырья для терапии СД, данные научной литературы свидетельствуют о наличии антимикробной фармакологической активности у эфирных масел [17–18], их индивидуальных соединений [19] и растительных экстрактов [20].

Анализ научной литературы позволил выбрать 3 вещества для разработки комбинированной субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева (*Melaleuca alternifolia*), 1,8-цинеол и (-)- α -бисаболол. Эфирное масло чайного дерева из листьев дикорастущего растения *Melaleuca alternifolia* [21] характеризуется высоким содержанием монотерпенов, в частности терпинен-4-ола, терпинолена, α -терпинена [22]. Богатый фитохимический состав масла определяет антисептический [23], фунгицидный [24], противовоспалительный [25] эффекты. Данные литературы свидетельствуют о наличии у эфирного масла листьев чайного дерева эффективности в лечении СД [26], не достигающей, однако, уровня клинической значимости [27].

Для повышения эффективности субстанции в качестве дополнительного компонента был рассмотрен 1,8-цинеол (эвкалиптол) из эфирного масла листьев *Eucalyptus globulus*, известного своими антибактериальными свойствами [28]. Данный моноциклический терпен с кислородным фрагментом может увеличивать проникновение компонентов через клеточные стенки микроорганизмов [29–30].

Сесквитерпеновый спирт (-)- α -бисаболол, обнаруженный и выделенный из эфирных масел *Vanillosmopsis erythropappa*, *Chamomilla recutita* и *Lavandula angustifolia*, известен своим противовоспалительным, ранозаживляющим и антибактериальным эффектом [31]. Наибольшей антибактериальной активностью обладает именно (-)- α -бисаболол, а не его рацемическая смесь [32].

В связи со значительным фитохимическим и фармакологическим потенциалом эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола данные вещества растительного происхождения были выбраны как потенциальные компоненты для разработки комбинированной субстанции и изучения ее таргетированной антимикробной активности, способствующей терапии СД.

Цель исследования – разработка антимикробной комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения поэтапно: от литературного поиска перспективных субстанций, анализа их состава методом ГХ-МС, оценки *in silico* степени сродства отдельных компонентов к патогенетическим мишеням, выбора оптимального состава комбинированной субстанции по результатам тестирования антимикробного действия *in vitro* до создания препарата на ее основе в форме лекарственного шампуня для терапии СД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанции и вспомогательные вещества

В качестве объектов исследования использовали эфирное масло листьев чайного дерева (Bernardi Group, Франция), 1,8-цинеол из листьев *Eucalyptus* spp. (Wuxi Lous Essence Co., Ltd., Китай), (-)- α -бисаболл из листьев *Hymenocraete yazdianus* (Merck KGaA, Германия) и комбинированную субстанцию на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола в массовом соотношении 1:1:1. Именно этот состав показал максимальную синергетическую и таргетированную антимикробную активность в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Candida albicans*), сопоставимую с клинически рекомендованными синтетическими субстанциями бензалкония хлорида, кетоконазола и климбазола [33–34].

В качестве стандартных образцов (СО) для ТСХ и ГХ-МС использовали терпинен-4-ол (чистота 99,5 %, Ernesto Ventos S.A., Испания), 1,8-цинеол (чистота 99,5 %, Ernesto Ventos S.A., Испания) и (-)- α -бисаболл из листьев *Vanillomopsis erythrorappa* (чистота 95 %, Ernesto Ventos S.A., Испания). Для сравнительной оценки антимикробной активности разработанной субстанции растительного происхождения были использованы субстанции кетоконазола (Sigma-Aldrich, США), климбазол (Symrise AG, Германия) и бензалкония хлорид (ООО ПК «Реми», Россия).

В качестве вспомогательных веществ (ВВ) с надлежащими техническими спецификациями производителей для разработки формулы лекарственного шампуня использовались **кокосульфат** натрия Sulforon® 1216 G (BASF, Германия), **кокоглюкозид** Plantacare® 818 UP (BASF, Германия), кокамидопропилбетаин **Dehyton® K45** (BASF, Германия), **лаурилглюкозид** Plantacare® 1200 UP (BASF, Германия), поликватерниум-67 **SoftCAT™ Polymer SL-30** (Dow, Южная Корея), глицерин (Roquette, Франция), глютамат диацетат тетранатриевая соль **Dissolvine® GL** (Nouryon, Нидерланды), триметилглицин GENENCARE® OSMS BA (IFF, Финляндия), пантенол D-Panthenol® 75W (BASF, Германия), токоферила ацетат Vitamin E Acetate Care (BASF, Германия), консервант на основе бензоата натрия и сорбата калия **Euxyl™ K712** (Schulke & Mayr GmbH, Германия), **лимонной кислоты** моногидрат (Shine Biotech International Co., Ltd., Таиланд).

Приготовление испытуемого раствора комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и (-)- α -бисаболл смешивали в массовом соотношении 1:1:1. 0,2 мл полученной комбинированной субстанции растворяли в 10 мл толуола, затем разбавляли в 8 раз толуолом.

Оценка подлинности субстанции методом ТСХ

Реактивы и расходные материалы для ТСХ: хроматографические пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке марки «TLC Silica gel 60 F254» размером 10 × 10 см (Merck KGaA, Германия), хлороформ («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), этилацетат («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), толуол («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), метанол («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), муравьиная кислота («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), уксуснокислый раствор пара-анисового альдегида в метаноле (ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы»).

Приготовление растворов СО терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола: 50 мкл СО каждой субстанции растворяли в 10 мл толуола, далее каждый полученный раствор разбавляли в 8 раз толуолом.

Подвижная фаза.

В целях выбора наиболее оптимальной подвижной фазы для ТСХ новой комбинированной субстанции изучались следующие смеси: толуол – этилацетат (85:15), толуол – этилацетат (80:20), толуол – этилацетат – метанол (85:10:5), толуол – этилацетат – метанол – муравьиная кислота (90:4:4:2).

На хроматографическую пластинку наносили 10 мкл испытуемого раствора и растворов СО полосами шириной 1 см, **сушили** на воздухе, помещали в камеру и хроматографировали восходящим способом. Далее её вынимали из камеры, сушили около 10 мин, опрыскивали уксуснокислым раствором анисового альдегида в метаноле с помощью мелкодисперсного распылителя, выдерживали при 100–105 °С в течение 10 мин и просматривали при дневном свете.

Оценка подлинности и количественное определение субстанции методом ГХ-МС

Определение полного химического состава комбинированной субстанции растительного происхождения и количественное определение компонентов проводились методом ГХ-МС с использованием для расчета процентной нормализации [35] в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография» **Государственной фармакопеи (ГФ) XIV издания**¹. Проверку пригодности хроматографической системы проводили в соответствии с ОФС.1.5.2.0001.15 «Эфирные масла»².

Приготовление испытуемого раствора субстанции для ГХ-МС: 1,5 мл новой субстанции растворяли в 10 мл хлороформа, далее последовательно разбавляли хлороформом в 200 раз.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <https://femb.ru/record/pharmasoreia14>. Ссылка активна на 23.02.2024.

² Там же.

Приготовление стандартного раствора субстанции для ГХ-МС: растворяли 0,15 мг терпинен-4-ола, 0,5 мг 1,8-цинеола и 0,5 мг (-)- α -бисаболола в 10 мл хлороформа, далее последовательно разбавляли хлороформом в 200 раз.

Условия хроматографирования: газовый хроматограф Shimadzu GCMS-TQ8040 с автосамплером AOC-5000 Plus и масс-детектором Shimadzu QP2010 Ultra (Япония); хроматографическая колонка HP-INNOWax, 30 м \times 0,25 мм, 0,25 мкм; газ-носитель – гелий; деление потока – 1:40; скорость потока газа-носителя – 1,5 мл/мин; температура инжектора – 240 °С; программа градиента температур термостата колонки: 0–1 мин – 80 °С, подъем температуры со скоростью 10 °С/мин до 140 °С, затем подъем температуры со скоростью 20 °С/мин до 240 °С, выдерживание при конечной температуре 240 °С в течение 10 мин. Объем вводимой пробы составил 1 мкл [35]. Оценку количественного содержания компонентов субстанции проводили методом внутренней нормализации, устанавливая пределы процентного содержания компонентов в субстанции.

Масс-спектрометр: электронная ионизация (EI) при 70 эВ; квадрупольный анализатор масс; диапазон – 29–500 m/z ; температура интерфейса детектора – 240 °С. Интерпретацию масс-спектров и индексов удерживания компонентов субстанции осуществляли с помощью известных библиотеки данных NIST-2017.

Валидация методики ГХ-МС была проведена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIV издания по следующим параметрам: специфичности, аналитической области, линейности, правильности, прецизионности в виде повторяемости (сходимости) и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности¹.

Молекулярный докинг и определение вида фармакологической активности методами *in silico*

Молекулярный докинг идентифицированных ГХ-МС соединений осуществлялся в отношении мишени ABC-транспортеров микроорганизмов с использованием программы AutoDock 4.2, а прогностическая оценка их фармакологической активности – с использованием программы Phyto4Health [36]. При изучении каждого вида фармакологической активности оценивали вероятности наличия (P_a , %) и отсутствия (P_i , %) ее проявления лигандом. Фармакологическая активность принималась значимой от значения вероятности $P_a > 0,5$ при минимальном значении P_i .

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. Ссылка активна на 23.02.2024.

Для определения антимикробной активности использовался метод двукратных серийных разведений в жидких питательных средах Мюллера – Хинтон и декстрозного агара Сабуро с использованием 96-луночных планшетов [37]. Тест-культуры с концентрацией 106 КОЕ/мл: стандартные штаммы *S. aureus* ATCC® 29213, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *S. epidermidis* ATCC® 14990, *Micrococcus luteus* ATCC® 10240a, а также *C. albicans* ATCC® 10231 и *M. furfur* ATCC® 14251. Разведения исследуемых веществ от 40 до 1,25 мг/мл готовили в бульоне Мюллера – Хинтон с добавлением 0,3%-го полисорбата-20, далее вносили в лунки в количестве 200 мкл и двукратно разводили. Субстанции сравнения: бензалкония хлорид, кетоконазол и климбазол. Отрицательный контроль: лунки, не содержащие тестируемых веществ (контроль роста культуры). Инкубировали при 37 °С в течение 24–48 ч. Оценку жизнеспособности проводили визуально с использованием 0,01%-го раствора резазурина. За наименьшую минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемого вещества принимают концентрацию разведения, где не происходит образования розового продукта трансформации резазурина.

Определение антимикробного взаимодействия соединений в субстанции методом шахматной доски [38]. Показателем характера совместного антимикробного действия веществ являлся индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывали по формуле [39].

Определение противогрибкового эффекта лекарственного шампуня с комбинированной субстанцией растительного происхождения методом серийных макроразведений и расчетом показателя снижения \log_{10} CFU [33]. Тест-культуры *C. albicans* ATCC® 10231 и *M. furfur* ATCC® 14251 с концентрацией 106 КОЕ/мл в количестве 1 мл смешивали с 9 мл лекарственного шампуня. Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Отрицательный контроль: пробирки, не содержащие тестируемых веществ. Оценку роста проводили на среде CHROMagar™ Malassezia путем расчета показателя \log_{10} CFU, снижение которого более чем на 2 единицы соответствовало 99,0%-му противогрибковому действию лекарственного шампуня.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»² с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel (версия 2016). Рассчитывали среднее значение со стандартными отклонениями в каждой исследуемой группе. Статистическую значимость различий полученных данных принимали при уровне $p < 0,05$.

² Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. Ссылка активна на 23.02.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор подвижных фаз для аналитической методики ТСХ осуществляли на основе научных данных о ТСХ многокомпонентных субстанций и их индивидуальных соединений [39, 40], рекомендуемых в качестве компонентов подвижной фазы комбинации толуола, этилацетата и муравьиной кислоты. Изучались подвижные фазы «толуол – этилацетат» (85:15; 80:20) и с добавлением метанола – «толуол – этилацетат – метанол» (85:10:5), «толуол – этилацетат – метанол – муравьиная кислота» (90:4:4:2). Введение метанола в последние две подвижные фазы увеличивало скорость движения фронта растворителя и за счет увеличения полярности улучшало разделение зон. Оптимальное разделение терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола достигалось в подвижной фазе «толуол – этилацетат – метанол» (85:10:5).

По результатам планарной ТСХ в восходящем токе растворителя было обнаружено 5 пятен, соответствующих терпинен-4-олу, 1,8-цинеолу, (-)- α -бисабололу и двум неидентифицированным соединениям из класса терпенов (рисунок 1, таблица 1). Для каждого обнаруженного вещества рассчитывали R_f , фиксировали цвет и сравнивали с зонами СО терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола.

Метод ГХ-МС позволил провести качественный анализ основных компонентов комбинированной субстанции по их временам удерживания и количественное определение (рисунок 2). Всего было обнаружено 15 соединений с преобладанием терпинен-4-ола (16,98 %), 1,8-цинеола (25,63 %) и (-)- α -бисаболола (27,67 %), определяющих основной антимикробный

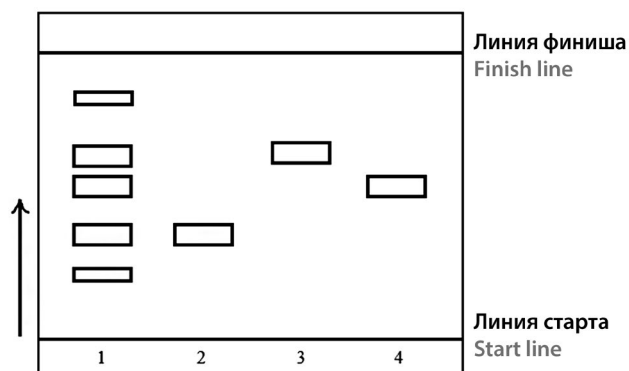


Рисунок 1. Хроматограмма комбинированной субстанции на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола:

1 – комбинированная субстанция; 2 – СО терпинен-4-ола; 3 – СО 1,8-цинеола; 4 – СО (-)- α -бисаболола

Figure 1. Chromatogram of the combined substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and (-)- α -bisabolol:

1 – combined substance; 2 – SS of terpinene-4-ol; 3 – SS of 1,8-cineole; 4 – SS of (-)- α -bisabolol

эффект субстанции [35]. Химические структуры терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола представлены на рисунке 3.

Терпинен-4-ол является преобладающим компонентом эфирного масла листьев чайного дерева [23]. 1,8-цинеол также является вторичным метаболитом в составе эфирного масла чайного дерева с содержанием до 10 % [41], поэтому пик 1,8-цинеола является суммированным из чистой субстанции 1,8-цинеола и вторичного 1,8-цинеола из эфирного масла листьев чайного дерева.

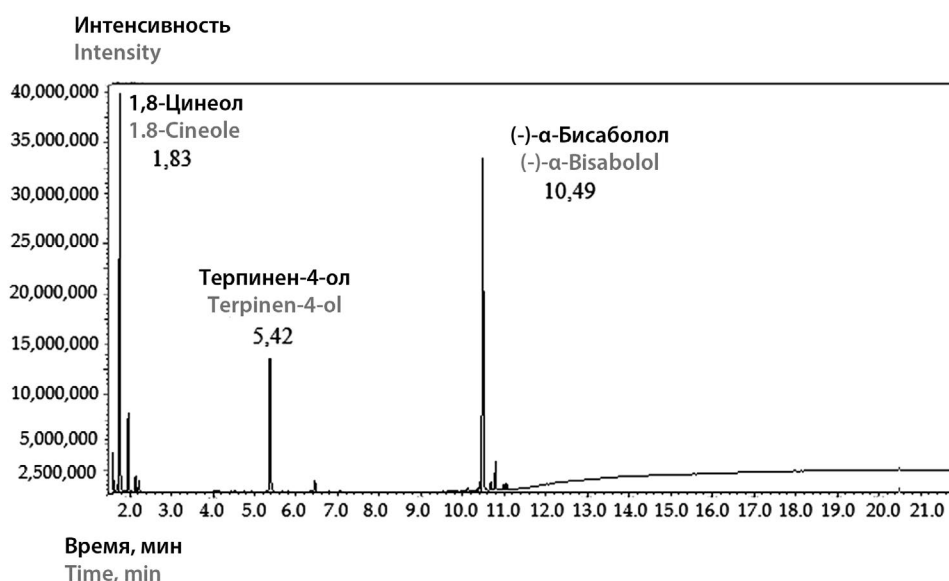


Рисунок 2. ГХ-МС комбинированной субстанции на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола

Figure 2. GC-MS of the combined substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and (-)- α -bisabolol

Таблица 1. Показатели подлинности новой комбинированной субстанции методом планарной ТСХ

Table 1. Qualitative parameters of the novel combined substance by planar TLC

№	Соединение Compound	Окраска пятна в видимом свете Color of a spot under sunlight	$R_f \pm SD$ ($n = 3$)
1	Не идентифицировано Not identified	Коричневая Brown	$0,47 \pm 0,01$
2	Терпинен-4-ол Terpinen-4-ol	Красно-коричневая Red-brown	$0,54 \pm 0,03$
3	(-)- α -Бисаболол (-)- α -Bisabolol	Розовато-красная Pinkish red	$0,64 \pm 0,03$
4	1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Фиолетово-коричневая Purple-brown	$0,71 \pm 0,02$
5	Не идентифицировано Not identified	Розово-пурпурная Pink-purple	$0,97 \pm 0,01$

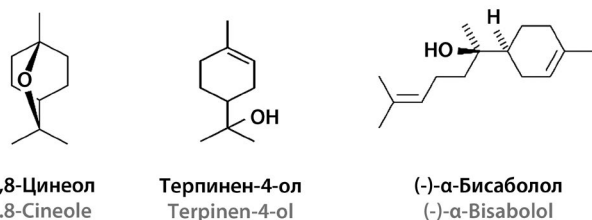


Рисунок 3. Химические формулы терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола

Figure 3. Chemical structures of terpinene-4-ol, 1,8-cineole and (-)- α -bisabolol

В субстанции преобладают монотерпены и различные терпеноиды (таблица 2). β -Бисаболол, фарнезол и транс-геранилгераниол являются родственными примесями (-)- α -бисаболола [35]. Хорошее разделение соединений в комбинированной субстанции обусловлено выбранными условиями хроматографирования и детектирования. В частности, использование масс-детектирования позволило определить α -фелландрен и α -терпинен даже при близких временах удерживания.

Выбранная методика ГХ-МС была валидирована в соответствии с требованиями Ph. Eur. 11.0, ГФ XIV издания и параметрами рекомендаций ИСН^{1,2} для последующего химического анализа и контроля качества субстанции в лабораторных условиях [35].

Хроматографическая система была пригодной: >10000 теоретических тарелок, разрешение между основными пиками >2,0 и относительное стандартное отклонение площадей пиков терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола менее 3,2 %. Совпадение масс-спектров соединений с масс-спектрами из

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: <https://femb.ru/record/pharmacopeia14>. Ссылка активна на 23.02.2024.

² European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/details/EuropeanPharmacopoeia80/page/n5/mode/2up>. Accessed: 23.02.2024.

библиотеки NIST-2017 составило более 96 %. Выбранная аналитическая область методики обладала линейностью ($R^2 > 0,995$). Открываемость терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола находилась в пределах от 98,3 до 101,6 % ($n = 9$). Коэффициент вариации результатов шести измерений имел значение от 1,28 до 2,47 %. Коэффициент вариации в рамках внутрилабораторной прецизионности находился в пределах от 1,27 до 2,56 %.

Таблица 2. Соединения комбинированной субстанции, идентифицированные методом ГХ-МС

Table 2. Compounds of the combined substance identified by GC-MS

Название идентифицированного вещества Name of identified compound	Химический класс Chemical class	t_R , мин $t_{R'}$, min	Относительное содержание, % Relative content, %
β -Мирицен β -Myrcene	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	1,55	$0,27 \pm 0,01$
α -Фелландрен α -Phellandrene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,66	$3,86 \pm 0,02$
α -Терпинен α -Terpinene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,67	$3,86 \pm 0,02$
D-Лимонен D-Limonene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,77	$0,45 \pm 0,03$
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Бициклический оксид монотерпена Bicyclic epoxyoxygenated monoterpene	1,83	$25,63 \pm 0,12$
γ -Терпинен γ -Terpinene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	2,05	$10,36 \pm 0,05$
m-Цимол m-Cymene	Ароматический монотерпен Aromatic monoterpene	2,23	$3,78 \pm 0,01$
Терпинен-4-ол Terpinene-4-ol	Бициклический оксид монотерпен Bicyclic oxygenated monoterpene	5,42	$16,98 \pm 0,09$
α -Терпинеол α -Terpineol	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	6,49	$15,31 \pm 0,03$
δ -Кадинен δ -Cadinene	Бициклический сесквитерпен Bicyclic sesquiterpene	7,08	$0,31 \pm 0,01$
β -Бисаболол β -Bisabolol	Сесквитерпен Sesquiterpene	10,13	$0,27 \pm 0,02$
β -Кариофиллен β -Caryophyllene	Сесквитерпен Sesquiterpene	10,2	$0,79 \pm 0,01$
(-)- α -Бисаболол (-)- α -Bisabolol	Моноциклический сесквитерпеновый спирт Monocyclic sesquiterpene alcohol	10,49	$27,67 \pm 0,21$
Фарнезол Farnesol	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	10,80	$2,52 \pm 0,01$
Транс-геранилгераниол Trans-geranylgeraniol	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	11,00	$0,55 \pm 0,01$

Молекулярный докинг выявил значительное сродство основных компонентов субстанции с TMD- и NBD-доменами в составе ABC-транспортера микроорганизмов (рисунок 4). Средние значения энергии связывания терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола составили -4,6, -4,2 и -5,1 ккал/моль соответственно. Олигомицин А и кетоконазол обладали более значительным, выше среднего сродством к TMD-домену, но не обеспечивали ингибирования NBD-домена и, соответственно, полной защиты от обратного выброса ЛС из клеток микроорганизмов. Климбазол обладал сопоставимым сродством к мишени, как и основные соединения субстанции. Связывание с несколькими доменами мишени позволяет повысить антимикробную активность и снизить риск развития антимикробной резистентности.

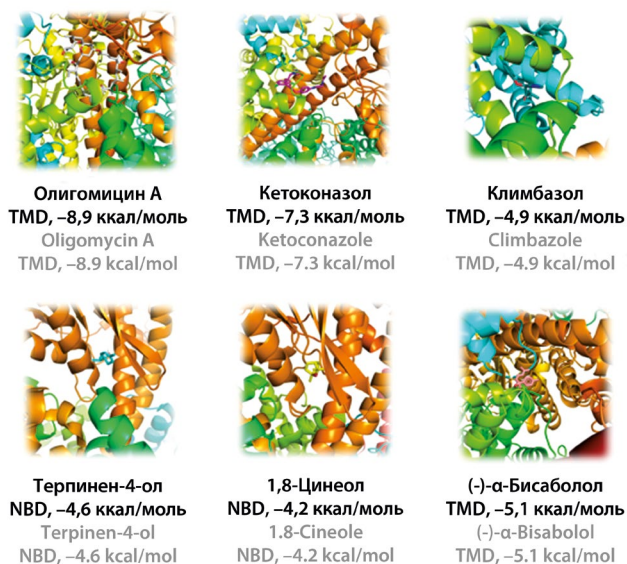


Рисунок 4. Сродство и энергии связывания изучаемых соединений с доменами ABC-транспортеров микроорганизмов

Figure 4. Affinity and binding energies of investigated compounds for domains of ABC-transporters

С помощью программы Phyto4Health для терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола было предсказано наличие нескольких видов фармакологической активности: противовоспалительной, фунгицидной, иммуносупрессивной, анальгетической и противопсориатической (таблица 3). Использование комбинированной субстанции позволит влиять на различные патогенетические составляющие СД. Для 1,8-цинеола предсказана низкая собственная антибактериальная активность, однако соединение может увеличивать проникновение терпинен-4-ола и (-)- α -бисаболола в клетки микроорганизмов. (-)- α -Бисаболол является усилителем фунгицидного действия других соединений при совместном присутствии. Наличие у соединений противовоспалительной

активности, включая анальгетическую активность, позволит нивелировать воспалительные проявления при СД.

Таблица 3. Прогноз фармакологической активности соединений с использованием программы Phyto4Health

Table 3. Prediction of the pharmacological activity of compounds using Phyto4Health tool

Название соединения Compound name	Активность Activity	P_a	P_i
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Анальгетическая Analgesic	0,728	0,011
	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,552	0,068
Терпинен-4-ол Terpinene-4-ol	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,875	0,007
	Иммуносупрессивная Immunosuppressant	0,786	0,004
	Анальгетическая Analgesic	0,685	0,015
	Фунгицидная Antifungal	0,613	0,007
(-)- α -Бисаболол (-)- α -Bisabolol	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,848	0,009
	Противопсориатическая Antipsoriatic	0,641	0,008
	Иммуносупрессивная Immunosuppressant	0,602	0,013
	Фунгицидная Antifungal	0,586	0,009
	Усилитель фунгицидной активности Antifungal enhancer	0,533	0,004

Бензалкония хлорид проявил неселективную антимикробную активность, нарушая качественный состав нормальной микрофлоры кожи головы и увеличивая риск развития резистентности. По результатам исследований, комбинированная субстанция обладала синергетической антимикробной активностью в отношении *S. epidermidis* и *S. aureus*, в то время как влияние на нормальную микрофлору – *M. luteus* было минимальным (таблица 4). МПК комбинированной субстанции составила 1,25 мг/мл в отношении *S. epidermidis* и *S. aureus*. Объединение эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и (-)- α -бисаболола позволило увеличить антибактериальную активность субстанции и сделать ее таргетированной в отношении патогенетической микрофлоры СД [33].

Новая комбинированная субстанция проявила выраженную противогрибковую активность (таблица 5). МПК комбинированной субстанции составила 5,0 мг/мл и 2,5 мг/мл в отношении *M. furfur* и *C. albicans* соответственно. Кетоконазол продемонстрировал более высокую противогрибковую активность, однако чувствительность микроорганизмов к данному ЛС снижается ввиду резистентности [10]. Климбазол обладает средней фунгицидной активностью и не является средством выбора при терапии СД, при

этом широко распространен как инструмент для устранения перхоти в составе парфюмерно-косметических средств.

Таблица 4. Антибактериальная активность соединений в отношении тест-штаммов бактерий

Table 4. Antibacterial activity of the compounds against bacterial test-strains

Название соединения Compound name	МПК, мг/мл MIC, mg/mL		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>M. luteus</i> ATCC 10240a
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	40,00	2,50	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева Tea tree essential oil	40,00	1,25	40,00
(-)- α -Бисаболол (-)- α -Bisabolol	5,00	1,25	20,00
Субстанция на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола, (-)- α -бисаболола (1:1:1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, (-)- α -bisabolol (1:1:1 mass ratio)	1,25	1,25	20,00
Бензалкония хлорид Benzalkonium chloride	5,00	5,00	5,00

Комбинации эфирного масла листьев чайного дерева с 1,8-цинеолом (1:1) и эфирного масла листьев чайного дерева с (-)- α -бисабололом (1:1) обладали явным синергизмом в отношении *C. albicans*, *S. epidermidis* и *S. aureus* (таблица 6). Добавление небольшого количества 1,8-цинеола **снизило** МПК эфирного масла листьев чайного дерева в 4 раза и позволило достичь индекса синергизма FICI < 1,0 в отношении *C. albicans* и *S. epidermidis*. Остальные комбинации веществ обладали аддитивным действием в отношении микроорганизмов.

По результатам проведенных исследований *in silico* и *in vitro* был разработан состав инновационного лекарственного шампуня в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0041.18 «Шампуни лекарст-

венные» ГФ XIV издания (таблица 7). Новый состав обладал высокой пенообразующей способностью (пенное число 222 ± 3), достаточной устойчивостью пены ($0,87 \pm 0,02$), средней вязкостью 5764 ± 27 и слабокислым pH $5,56 \pm 0,10$ [40], прошел цикл испытаний стабильности при 40 ± 2 °C в течение 6 месяцев.

Таблица 5. Противогрибковая активность соединений в отношении тест-штаммов дрожжеподобных грибов

Table 5. Antifungal activity of compounds against fungal test-strains

Название соединения Compound name	МПК, мг/мл MIC, mg/mL	
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>M. furfur</i> ATCC 14251
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	40,00	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева Tea tree essential oil	5,00	40,00
(-)- α -Бисаболол (-)- α -Bisabolol	20,00	20,00
Субстанция на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола, (-)- α -бисаболола (1:1:1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, (-)- α -bisabolol (1:1:1 mass ratio)	2,50	5,00
Климбазол Climbazole	10,00	10,00
Кетоконазол Ketoconazole	2,50	2,50

Выбор диапазона содержания активной фармацевтической субстанции в составе лекарственного шампуня обоснован данными об антимикробной активности. Противогрибковый эффект нового лекарственного шампуня был оценен в сравнении с климбазолом и кетоконазолом. МПК разведений фармацевтической субстанции в отношении выбранных стандартных штаммов бактерий и дрожжеподобных грибов составляет 1,25 и 2,50 мг/мл, что в составе лекарственного шампуня соответствовало концентрациям 0,125 и 0,25 масс.%. Лекарственный шампунь с 0,5 масс.% многокомпонентной субстан-

Таблица 6. Индексы антимикробного взаимодействия между компонентами субстанции

Table 6. Indexes of antimicrobial interaction between compounds in the substance

Значения FICI, Mean \pm SD FICI values, Mean \pm SD	Штаммы микроорганизмов Strains of microorganisms		
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990
Эфирное масло листьев чайного дерева + 1,8-цинеол Tea tree essential oil + 1,8-Cineole	1,056 \pm 0,159	1,913 \pm 0,276	0,344 \pm 0,125
Эфирное масло листьев чайного дерева + (-)- α -бисаболол Tea tree essential oil + (-)- α -Bisabolol	0,523 \pm 0,014	1,025 \pm 0,013	0,625 \pm 0,261
1,8-цинеол + (-)- α -бисаболол 1,8-Cineole + (-)- α -Bisabolol	1,316 \pm 0,472	3,052 \pm 0,565	1,500 \pm 0,435

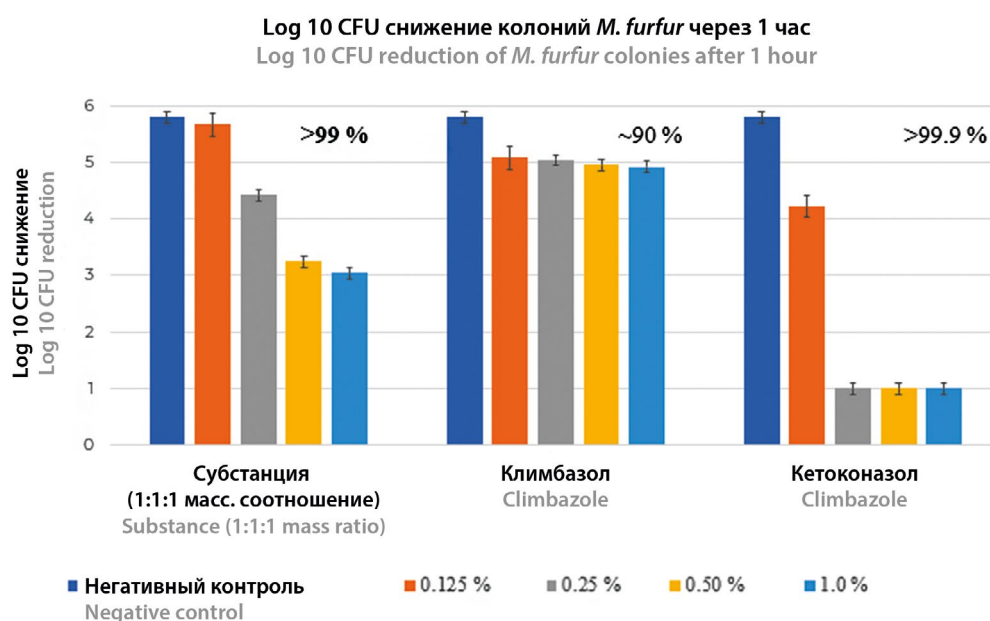


Рисунок 5. Противогрибковая эффективность лекарственных шампуней с активными веществами

Figure 5. Antifungal effect of the medical shampoos with active substances

ции подавлял рост *M. furfur* более чем на 2 порядка, что равнозначно 99%-му противогрибковому эффекту после 1 часа контакта (рисунок 5). Однако максимально выраженный антимикробный эффект лекарственного шампуня, сопоставимый с климбазолом и кетоконазолом, достигался при концентрации 1 масс.%. Данный эффект был значимее, чем у климбазола во всех концентрациях [42].

Таблица 7. Состав нового лекарственного шампуня с комбинированной субстанцией растительного происхождения

Table 7. Composition of the novel medical shampoo with the combined substance of plant origin

Название субстанции Name of substance	Функция Function	Количество, масс.% Quantity, wt. %
Вода очищенная Purified water	Растворитель Solvent	до 100,00
Кокосульфат натрия Sodium coco-sulfate	Анионное ПАВ Anionic surfactant	6,00
Кокоглюкозид Coco glucoside	Неионное ПАВ Nonionic surfactant	7,50
Лаурилглюкозид Lauryl glucoside	Неионное ПАВ Nonionic surfactant	5,00
Кокамидопропилбетаин Cocamidopropyl betaine	Амфотерное ПАВ Amphoteric surfactant	5,00
Поликватерниум-67 Polyquaternium-67	Кондиционирующий агент Conditioning agent	0,30
Глицерин Glycerine	Соразтворитель Cosolvent	3,00
Глютамат диацетат тетра-натриевая соль Tetrasodium glutamate diacetate	Комплексообразователь Complexing agent	0,50

Название субстанции Name of substance	Функция Function	Количество, масс.% Quantity, wt. %
Субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола, (-)- α -бисаболола (1:1:1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, (-)- α -bisabolol (1:1:1 mass ratio)	Активная фармацевтическая субстанция Active pharmaceutical substance	1,00
Бетаин Betaine	Увлажняющий компонент Moisturising agent	1,00
Пантенол Panthenol	Увлажняющий компонент Moisturising agent	0,50
Токоферил ацетат Tocopheryl acetate	Антиоксидант Antioxidant	0,05
Сорбат калия и бензоат натрия Euxyl™ K712 Potassium sorbate and sodium benzoate Euxyl™ K712	Консервант Preservative	0,70
Лимонной кислоты моногидрат Citric acid monohydrate	Регулятор pH pH regulator	0,75

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для разработки новой комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения для терапии СД применен комплексный подход с использованием молекулярного моделирования и методов медицинской химии. Субстанция про-

анализирована методами ТСХ и ГХ-МС. На хроматограммах идентифицированы терпены с преобладанием 1,8-цинеола, терпинен-4-ола и (-)- α -бисаболола. Разработанная методика ГХ-МС валидирована для последующего контроля качества.

Терпинен-4-ол из эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и (-)- α -бисаболол обладали достаточным сродством к доменам АВС-транспортёров, позволяя повысить антимикробную активность и снизить риск антимикробной резистентности патогенной микрофлоры СД. Их прогнозируемая фармакологическая активность предполагает воздействие на основные патогенетические мишени СД для коррекции хронической воспалительной реакции с одновременной регуляцией качественного состава микрофлоры кожи головы.

Разработанная субстанция обладает значительной и таргетированной антимикробной активностью в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД. Именно многокомпонентный химический состав обуславливает синергетическое антибактериальное и фунгицидное действие, сопоставимое с бензалкония хлоридом и кетоконазолом. Лекарственный шампунь с новой субстанцией соответствовал требованиям Государственной фармакопеи, обладал приятными органолептическими характеристиками и значительным противогрибковым эффектом. Представленные результаты подтверждают перспективность дальнейших исследований новой субстанции растительного происхождения, разработку инновационных ЛП для лечения СД, исследование их безопасности, дерматологической переносимости и клинической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*. 2012;33(1):10–19. DOI: 10.4103/0974-8520.100295.
- Earm K., Earm Y.E. Integrative approach in the era of failing drug discovery and development. *Integrative Medicine Research*. 2014;3(4):211–216. DOI: 10.1016/j.imr.2014.09.002.
- Pinzi L., Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4331. DOI: 10.3390/ijms20184331.
- Choeng W.K., Yeung C.K., Torsekar R.G., Suh D.H., Ungpakorn R., Widaty S., Azizan N.Z., Gabriel M.T., Tran H.K., Chong W.S., Shih I.-H., Dall'Oglio F., Micali G. Treatment of seborrheic dermatitis in Asia: a consensus guide. *Skin Appendage Disorders*. 2016;1(4):187–196. DOI: 10.1159/000444682.
- Gupta A.K., Madzia S.E., Batra R. Etiology and management of Seborrheic dermatitis. *Dermatology*. 2004;208(2):89–93. DOI: 10.1159/000076478.
- Borda L.J., Wikramanayake T.C. Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Investigative Dermatology*. 2015;3(2):10. DOI: 10.13188/2373-1044.1000019.
- Adalsteinsson J.A., Kaushik S., Muzumdar S., Guttman-Yassky E., Ungar J. An update on the microbiology, immunology and genetics of seborrheic dermatitis. *Experimental Dermatology*. 2020;29(5):481–489. DOI: 10.1111/exd.14091.
- Polonskaya A.S., Shatokhina E.A., Kruglova L.S. Seborrheic dermatitis: current ideas of the etiology, pathogenesis, and treatment approaches. 2020;19(4):451–458. (In Russ.) DOI: 10.17116/klindermat202019041451.
- Tao R., Li R., Wang R. Skin microbiome alterations in seborrheic dermatitis and dandruff: A systematic review. *Experimental Dermatology*. 2021;30(10):1546–1553. DOI: 10.1111/exd.14450.
- Leong C., Chan J.W.K., Lee S.M., Lam Y.I., Goh J.P.Z., Ianiri G., Dawson T.L. Azole resistance mechanisms in pathogenic *Malassezia furfur*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021;65(5):1975–2000. DOI: 10.1128/AAC.01975-20.
- Bukvić Mokoš Z., Kralj M., Basta-Juzbašić A., Lakoš Jukić I. Seborrheic dermatitis: an update. *Acta Dermatovenerologica Croatica*. 2012;20(2):98–104.
- Reuter J., Merfort I., Schempp C.M. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2010;11(4):247–267. DOI: 10.2165/11533220-000000000-00000.
- Olisova O.Y., Snarskaya E.S., Gladko V.V., Burova E.P. Russian traditional medicine in dermatology. *Clinics in Dermatology*. 2018;36(3):325–337. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2018.03.007.
- Karimi A., Majlesi M., Rafieian-Kopaei M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of Nephro Pharmacology*. 2015;4(1):27–30.
- Lynch N., Berry D. Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional, and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products. *Complementary Therapies in Medicine*. 2007;15(2):84–91. DOI: 10.1016/j.ctim.2006.06.007.
- Enioutina E. Yu., Teng L., Fateeva T.V., Brown J.C.S., Job K.M., Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Gubarev M.I., Sherwin C.M.T. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017;10(11):1203–1214. DOI: 10.1080/17512433.2017.1371591.
- Abers M., Schroeder S., Goelz L., Sulser A., St Rose T., Puchalski K., Langland J. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):124. DOI: 10.1186/s12906-021-03285-3.
- Jain S., Arora P., Nainwal L. M. Essential Oils as Potential Source of Anti-dandruff Agents: A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2022;25(9):1411–1426. DOI: 10.2174/1386207324666210712094148.
- Mączka W., Duda-Madej A., Górny A., Grabarczyk M., Wińska K. Can eucalyptol replace antibiotics? *Molecules*. 2021;26(16):4933. DOI: 10.3390/molecules26164933.
- Mustarichie R., Rostinawati T., Pitaloka D.A.E., Saptarini N.M., Iskandar Y. Herbal Therapy for the Treatment of Seborrhea Dermatitis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2022;2022(15):2391–2405. DOI: 10.2147/CCID.S376700.
- Ayatollahi A., Firooz A., Lotfali E., Mojab F., Fattahi M. Herbal Therapy for the Management of Seborrheic Dermatitis: A Narrative Review. *Recent Advances in Anti-Infective Drug Discovery*. 2021;16(3):209–226. DOI: 10.2174/2772434416666211029113213.
- Brophy J.J., Davies N.W., Southwell I.A., Stiff I.A., Williams L.R. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1989;37:1330–1335.
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(1):50–62. DOI: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*. 2003;95(4):853–860. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x.
- Brand C., Ferrante A., Prager R.H., Riley T.V., Carson C.F., Finlay-Jones J.J., Hart P.H. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflammation Research*. 2001;50(4):213–219. DOI: 10.1007/s000110050746.

26. Waldroup W., Scheinfeld N. Medicated shampoos for the treatment of seborrheic dermatitis. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2008;7(7):699–703.
27. Satchell A.C., Saurajen A., Bell C., Barnetson R.S. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;47(6):852–855. DOI: 10.1067/mjd.2002.122734.
28. Dhakad A.K., Pandey V.V., Beg S., Rawat J.M., Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;98(3):833–848. DOI: 10.1002/jsfa.8600.
29. Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(11):8022–8028.
30. Zengin H., Baysal A.H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*. 2014;19(11):17773–17779. DOI: 10.3390/molecules191117773.
31. Kamatou G.P.P., Viljoen A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;87(1):1–7.
32. De Lucca A.J., Pauli A., Schilcher H., Sien T., Bhatnagar D., Walsh T.J. Fungicidal and Bactericidal Properties of Bisabolol and Dragosantol. *Journal of Essential Oil Research*. 2011;23(3):47–54.
33. Filatov V.A., Kulyak O.Yu., Kalenikova E.I. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of a Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):328. DOI: 10.3390/ph16030328.
34. Filatov V.A., Kulyak O.Yu., Kalenikova E.I. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of an active plant-based quadrocomplex for skin hygiene. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2022;10(5):905–921.
35. Filatov V.A., Ilin E.A., Kulyak O.Yu., Kalenikova E.I. Development and Validation of a Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Analysis of the Novel Plant-Based Substance with Antimicrobial Activity. *Antibiotics*. 2023;12(10):1558. DOI: 10.3390/antibiotics12101558.
36. Ionov N., Druzhilovskiy D., Filimonov D., Poroikov V. Phyto4Health: Database of Phytocomponents from Russian Pharmacopoeia Plants. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2023;63(7):1847–1851. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01567.
37. Bellio P., Fagnani L., Nazzicone L., Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021;8:101543. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101543.
38. Odds F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(1):1. DOI: 10.1093/jac/dkg301.
39. Piovan A., Caniato R., Brun P., Costa V.D., Filippini R. Rapid and feasible TLC screening of tea tree oil commercial samples. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2021;10(1):175–180. DOI: 10.22271/phyto.2021.v10.i1c.13304.
40. Shaha A., Salunkhe V.R. Development and validation of a high performance thin layer chromatographic method for determination of 1,8-Cineole in *Callistemon Citrinus*. *Pharmacognosy Research*. 2014;6(2):143–147.
41. Hendry E.R., Worthington T., Conway B.R., Lambert P.A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(6):1219–1225. DOI: 10.1093/jac/dkp362.
42. Filatov V.A., Kulyak O.Yu., Kalenikova E.I. The Development of Medical Shampoo with a Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis. *Medical Sciences Forum*. 2023;21(1):51. DOI: 10.3390/ECB2023-14084.