

УДК 615.277.3



ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *IN VIVO* ВОДНОГО И СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТОВ *THYMUS MARSCHALLIANUS* WILLD

А.С. Шереметьева, А.М. Напшева, Н.А. Дурнова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112

E-mail: anna-sheremetyewa@yandex.ru

Получено 11.08.2021

После рецензирования 10.10.2021

Принята к печати 30.10.2021

Цель. Изучить противоопухолевую активность водного и спиртового экстрактов тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.) на самцах беспородных белых крыс с перевитой опухолью печени РС-1.

Материалы и методы. Объект исследования – измельченная трава тимьяна Маршалла, которая собрана в окрестностях города Саратова в фазе цветения. Экстракты из указанного растительного материала были приготовлены двумя разными способами: в одном, в качестве экстрагента использовали воду, в другом – спирт этиловый 95%-ный. В эксперименте использовано 15 самцов беспородных белых лабораторных крыс массой 200±50 г, которым имплантировали подкожно, в область лопатки, альвеолярный рак печени – РС-1. Животные с перевитой опухолью методом случайной выборки были разделены на 3 группы по 5 крыс: первая, контрольная, не получавшая экстракт; вторая, опытная, получавшая спиртовой экстракт тимьяна Маршалла; третья, опытная, получавшая водный экстракт тимьяна Маршалла. Для изучения патоморфоза опухоли применялись морфологические и морфометрические методы с использованием стандартной гистологической окраски гематоксилином и эозином.

Результаты. Экспериментально установлено, что спиртовой и водный экстракты тимьяна Маршалла обладают противоопухолевой активностью. Морфологическое исследование опухолей животных показало снижение количества сохранных опухолевых клеток в поле зрения, выраженные некробиотические и атрофические изменения клеток опухоли, отсутствие митозов, разрастание соединительнотканых волокон, что соответствует II–III степени патоморфоза опухоли.

Заключение. Водный экстракт тимьяна Маршалла проявил более сильную противоопухолевую активность. При его введении в опухолевую ткань выявлены морфологические признаки апоптоза: появление апоптотических телец, кариопикноз и конденсация ядерного хроматина в опухолевых клетках. Можно предположить, что более выраженный противоопухолевый эффект водного экстракта обусловлен большим выходом флавоноидов.

Ключевые слова: экстракт; *Thymus marschallianus* Willd.; противоопухолевая активность

Список сокращений: ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; МТС – метастазы; ГФ РФ XIV изд. – Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания.

ANTITUMOR ACTIVITY *IN VIVO* OF AQUEOUS AND ALCOHOLIC EXTRACTS OF *THYMUS MARSCHALLIANUS* WILLD

A.S. Sheremetyewa, A.M. Napsheva, N.A. Durnova

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky
112, Bolshaya Kazachya Str., Saratov, Russia, 410012

E-mail: anna-sheremetyewa@yandex.ru

Received 11 Aug 2021

After peer review 10 Oct 2021

Accepted 30 Oct 2021

Для цитирования: А.С. Шереметьева, А.М. Напшева, Н.А. Дурнова. Противоопухолевая активность *in vivo* водного и спиртового экстрактов *Thymus Marschallianus* Willd. *Фармация и фармакология*. 2021;9(6):476-484. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-6-476-484

© А.С. Шереметьева, А.М. Напшева, Н.А. Дурнова, 2021

For citation: A.S. Sheremetyewa, A.M. Napsheva, N.A. Durnova. Antitumor activity *in vivo* of aqueous and alcoholic extracts of *Thymus Marschallianus* Willd. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(6):476-484. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-6-476-484

The aim of research is to study the antitumor activity of aqueous and alcoholic extracts of *Thymus marschallianus* Willd. on male outbreed white rats with transplanted liver tumor PC-1.

Materials and methods. The object of study is crushed grass of *Thymus marschallianus* Willd.: collected in the Saratov vicinity in the flowering phase. Extracts from the specified plant material were made in two different ways: first way, water was used as an extractant, in the other, ethyl alcohol 95%. 15 male outbreed white laboratory rats weighing 200 ± 50 were used in experiment. The subcutaneous injections of alveolar liver cancer RS-1 were made in scapula area. Animals with transplanted tumor were randomly divided into 3 groups of 5 rats: the first was a control (negative control) that did not receive extract; the second was an experimental one that receiving alcoholic extract of *Thymus marschallianus* Willd.; the third was an experimental one that receiving aqueous extract of *Thymus marschallianus* Willd. To study the pathomorphosis of the tumor, morphological and morphometric methods were used standard histological staining with hematoxylin and eosin.

Results It has been established that alcoholic and aqueous extracts of *Thymus marschallianus* Willd. have antitumor activity. Morphological examination of animal tumors showed a decrease in the number of preserved tumor cells in the view field, pronounced necrotic and atrophic changes in tumor cells, absence of mitosis, proliferation of connective tissue fibers corresponding to the II-III degree of tumor pathomorphosis.

Conclusion. *Thymus marschallianus* Willd. aqueous extract showed more potent antitumor activity. Introduction into tumor tissue revealed morphological signs of apoptosis: the appearance of apoptotic bodies, karyopycnosis, and condensation of nuclear chromatin in tumor cells. It can be assumed that the more pronounced antitumor effect of the aqueous extract is due to the higher yield of flavonoids.

Keywords: extract; *Thymus marschallianus* Willd.; antitumor activity

Abbreviations: NCI – nuclear cytoplasmic index; WHO – World Health Organization; MTS – metastases; SP RF XIV^{ed} – State Pharmacopoeia of Russian Federation XIV edition.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)¹, рак является второй из основных причин смертности в мире. В 2018 г. от этого заболевания умерли 9,6 млн человек, рак становится причиной практически каждой шестой смерти в мире. Основными методами лечения рака являются операционная, химио- и лучевая терапия². Однако доказана противоопухолевая активность как отдельных природных соединений (алкалоиды, терпеноиды, хиноны), так и растительных экстрактов в целом, например, аконита байкальского (*Aconitum baicalense* Turcz. ex Rapaics семейство *Ranunculaceae*) [2], каланхоэ Дегремона (*Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & N.Perrier семейство *Crassulaceae*), алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill. семейство *Asphodelaceae*) [3], лекарственные препараты из которых назначают в комплексном лечении рака [1]. Как потенциальные противоопухолевые соединения изучаются флавоноиды, полисахариды и др. [1]. Растительные извлечения являются перспективным объектом исследований в области онкотерапии из-за возможности нахождения веществ с новым механизмом действия, позволяющим адресно воздействовать на опухолевые клетки не повреждая нормальные. Основными химическими соединениями тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.) являются эфирное масло, фенольные соединения, тритерпеновые соединения, полисахаридные комплексы, минеральные элементы, аминокислоты, органические кислоты [4–11], что делает его перспективным с точки зрения изучения противоопухолевой активности.

Ранее изучалась противоопухолевая активность представителей рода тимьян (*Thymus* L.), произрастающих на территориях разных стран – *T. algeriensis* [12–13], *T. vulgaris* [12, 14–17], *T. serpyllum*, [12, 18–19], *T. caramanicus*, *T. carnosus* Boiss., *T. citriodorus*, *T. mastichina*, *T. pulegioides*, *T. satureioides*, *T. schimperii*, *T. zygis* [12]. Например, *in vitro* показаны антипролиферативные эффекты этанольного лиофильного экстракта и эфирного масла *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. с использованием теста МТТ, которые оценивались на пяти линиях раковых клеток человека: на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231, клетках аденокарциномы человека HeLa, линии клеток рака предстательной железы человека PC3 и линии клеток лейкемии человека K56S [13]. Эфирное масло показало большую эффективность в подавлении роста раковых клеток всех линий, чем этанольные экстракты. Так, для этанольного экстракта значение LD₅₀ составило более 10000 мкг/мл, а для эфирного масла значение LD₅₀ было в диапазоне 300–1067 мкг/мл в отношении различных линий раковых клеток, использованных в этом исследовании. В качестве положительного контроля был использован доксорубин (противоопухолевый препарат), который продемонстрировал значения LD₅₀ в диапазоне от 1 до 20 мкг/мл [13]. В другом эксперименте [16] показан антипролиферативный эффект эфирного масла *Thymus vulgaris* L. на линии клеток MCF-7 и MDA-MB-231 с помощью колориметрических анализов МТТ (для контроля цитотоксичности) и ELISA (для контроля клеточной пролиферации). Результаты показали, что эфирное масло тимьяна обыкновенного значительно снижало метаболическую активность и впоследствии выживаемость клеток в обеих тестируемых клеточных линиях: при концентрации 0,12 мкг/мл – линии клеток MDA-

¹ World Health Organization. Cancer. 2021. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

² Там же.

MB-231 и 0,13 мкг/мл – линии клеток MCF-7 [16]. Метанольный экстракт тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) показал противораковую активность на линии клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека (HCEpC), которая была установлена с помощью МТТ-теста. В эксперименте использован диапазон концентраций 500–2500 мкг/мл, при котором цитотоксичность изменялась от 50 до 100% соответственно [18]. Кроме того, установлена способность экстракта тимьяна ползучего индуцировать апоптоз линии опухолевых клеток рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB-231), при этом не проявляя цитотоксического действия на линии здоровых клеток молочной железы (MCF-10A) человека [19].

Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.), являющийся официальным видом, причем на территории Саратовской области, встречается в качестве редкого заносного вида и, ресурсного значения в регионе он не имеет [20]. Наиболее распространенным на территории Саратовской области является близкородственный вид – тимьян Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.). Близкородственные растения часто проявляют подобное фармакологическое действие, так как обладают аналогичным химическим составом [21]. Так, например, дикорастущий тимьян Маршалла ранее показал отхаркивающую, противовоспалительную, ангиопротекторную, антиоксидантную активности, как и фармакопейный вид – тимьян ползучий. Эффекты этих двух видов были сопоставимы [22]. При этом количественное содержание эфирных масел в траве тимьяна Маршалла превосходило содержание масел в траве тимьяна ползучего [23].

Следует отметить, что большинство исследований противоопухолевой активности представителей рода тимьян были основаны на опытах *in vitro* [12–15, 17–19], тогда как экспериментов *in vivo* [16] очень мало. Сведения о влиянии экстрактов из сырья тимьяна Маршалла на клетки опухоли в литературе отсутствуют.

ЦЕЛЬ. Изучить противоопухолевую активность водного и спиртового экстрактов тимьяна Маршалла на самцах беспородных белых крыс с перевитой опухолью печени РС-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использована измельченная трава тимьяна Маршалла, которая собрана в окрестностях г. Саратова в июне-июле 2018 г. в фазе цветения. Определение вида проводилось по ключу В.Н. Гладковой и Ю.Л. Меницкого во «Флоре европейской части СССР»³. Сырье сушили в сухом, хорошо проветриваемом месте, затем измельчали до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

³ Федоров А.А., Меницкий Ю.Л. Флора европейской части СССР – Л.: Наука, 1978. – 259 с.

Методика приготовления экстрактов

Экстракты из указанного растительного материала были приготовлены двумя разными способами:

1. Согласно методике Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV изд.) ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары», 10 г сырья помещали в предварительно нагретый на кипящей водяной бане стакан, заливали 100 мл воды комнатной температуры (соотношение сырья и экстрагента 1:10), закрывали крышкой и настаивали на водяной бане в течение 15 мин, а затем при комнатной температуре – 45 мин. Полученное извлечение упаривали на водяной бане до получения густого экстракта (выход составил 1,0±0,2 г), а затем разводили водой для инъекций до концентрации 100 мг/мл.

Технология данного способа экстракции регламентирована ГФ РФ XIV изд., валидирована и легко воспроизводима.

2. Согласно запатентованной методике [24] двукратную экстракцию проводили спиртом этиловым 95% (10 г сырья заливали 100 мл спирта) кипятили в течение 15 мин, полученное извлечение сливали, оставшееся сырье снова заливали 100 мл спирта, доводили до кипения и сливали к первому извлечению. Полученный экстракт упаривали на водяной бане до состояния густого экстракта, разводили дистиллированной водой, очищали хлорформом, центрифугировали в течение 15 мин, затем очищенную водную фракцию упаривали на водяной бане до получения густого экстракта (выход составил 0,4±0,1 г), а затем разводили водой для инъекций до концентрации 100 мг/мл.

Экстракт травы тимьяна Маршалла, полученный данным способом, ранее показал антимикробную активность [26]. Кроме того, у экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis*), полученного данным методом, ранее показана противоопухолевая активность [24, 26].

Работа с лабораторными животными

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих директиве 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Тема и описание экспериментов одобрены этической комиссией ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России (протокол №4 от 3 мая 2020 г.).

Дизайн эксперимента

В эксперименте, проводимом в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ⁴, использовано 15 самцов беспородных белых лабо-

⁴ Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Яворский А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // Москва: Гриф и К. – 2012. – 944 с.

раторных крыс массой 200 ± 50 г, которым имплантировали подкожно, в области лопатки, по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени – РС-1, полученного из банка опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Животные с перевитой опухолью методом случайной выборки были разделены на 3 группы по 5 крыс: первая – контрольная (негативный контроль), не получавшая экстракт; вторая – опытная, получавшая спиртовой экстракт тимьяна Маршалла; третья – опытная, получавшая водный экстракт тимьяна Маршалла. После достижения опухолью 1 см^3 (на 18-й день от начала эксперимента) в опытных группах крысам вводили экстракт внутривенно в дозе 100 мг/кг, один раз в сутки в течение следующих 14-ти дней (18-31 дни эксперимента). После отмены введения экстракта за лабораторными животными должно было осуществляться наблюдение в течение 7 суток (32–38 дни эксперимента), но в связи с распадом опухолевых образований в группе животных, получавших спиртовой экстракт тимьяна, животные всех групп были выведены из эксперимента досрочно на 32-й день.

Динамику роста опухоли оценивали по изменению ее объема по формуле:

$$V = A \times B \times C,$$

где: А – ширина, В – толщина, С – высота опухоли.

Измерения проводили штангенциркулем каждые два дня от начала эксперимента. Для анализа результатов высчитывали истинную массу животного, вычитая теоретическую массу опухоли (умножая объем опухоли на ее плотность) из массы при взвешивании и изменяли истинной массы:

$$M_{\text{истин.}} = M_{\text{жив.}} - V \times \rho,$$

где: $M_{\text{истин.}}/M_{\text{жив.}}$ – это масса при взвешивании; V – объем опухоли; ρ – плотность прививаемой опухоли $0,74 \text{ г/см}^3$ [26].

Изменение истинной массы тела животных (дельта) определяли путем вычитания массы животного до начала эксперимента из истинной массы животного в день эксперимента и выражали в процентах. На 32-е сутки крыс выводили из эксперимента и производили забор образцов ткани органов, опухоли, крови для дополнительных исследований.

Для изучения патоморфоза опухоли применялись морфологические и морфометрические методы с использованием стандартной гистологической окраски гематоксилином и эозином. При изучении ткани опухоли оценивали наличие дистрофических и некробиотических изменений, а также морфометрические показатели такие, как: диаметр опухолевой клетки, соотношение диаметров опухолевой клетки и её ядра, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ). Подсчет проводили на 100 клеток в 10 полях зрения каждого микропрепарата, с помощью Микровизора медицинского проходящего света $\mu\text{Vizo-101}$ (ЛОМО, Россия).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных признаков и проверку равенства генеральных дисперсий осуществляли с помощью критериев Шапиро-Уилка и точного критерия Фишера. Описательную статистику количественных признаков представляли в виде центральной тенденции – медианы (Me), интервала (минимальное и максимальное значение изучаемого признака) и интерквартильного размаха (25 и 75 процентиля). В тексте эти значения указывали как Me, [min-max], LQ; UQ). Различия между группами определяли с помощью критерия Краскела-Уоллиса, а также U-критерия Манна-Уитни. Уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У животных, получавших спиртовой экстракт тимьяна Маршалла, в середине эксперимента наблюдали заметный рост опухоли, но достоверных отличий от контроля не установлено ($P = 0,427$). У крыс, получавших водный экстракт, динамика изменения объема опухоли была сопоставима с измерениями в контрольной группе и не отличалась от нее ($P = 0,919$).

Животные всех групп набрали максимальный вес до того, как опухоль стала 1 см^3 в объеме (на 11-ый день). Во время эксперимента наблюдали колебания динамики истинной массы животных: в контрольной группе это изменение составило 4,6%. При введении экстракта тимьяна Маршалла (18–31 день) также наблюдали колебания динамики истинной массы животных: к концу эксперимента в группе, получавшей спиртовой экстракт, истинная масса тела крыс увеличилась на 2,7%, но данные изменения, при сравнении с контролем, были недостоверны ($P = 0,835$), а у животных, получавших водный экстракт, она увеличилась на 14,4% относительно массы на момент начала эксперимента по сравнению с контрольной группой ($P = 0,037$) (табл. 1).

Данные изменения свидетельствуют о том, что в группе животных, получавших водный экстракт тимьяна, снижение массы тела происходило медленнее, чем в контроле и группе, получавшей спиртовой экстракт.

При морфологическом исследовании выявлено, что перевиваемая опухоль в группе контроля состояла из ячеистых структур разной формы и величины, разделенными тонкими прослойками соединительной ткани (рис. 1). Опухолевые клетки овальной или округлой формы, в цитоплазме которых расположены крупные вакуоли, содержащие слизь и оттесняющие овальное ядро на периферию клетки. Количество митозов составило до 6-ти в одном поле зрения. Отмечены единичные опухолевые клетки в состоянии некроза.

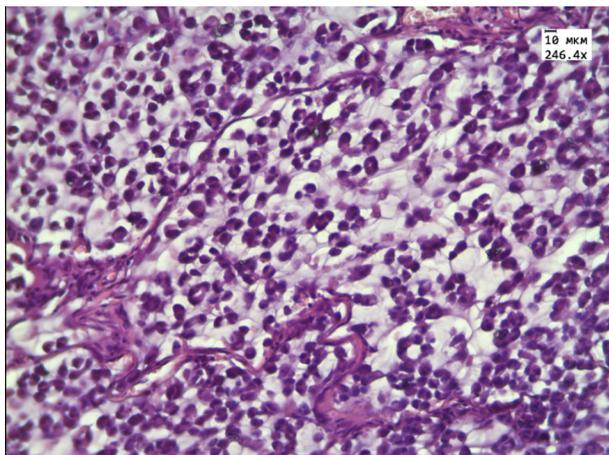


Рисунок 1 – Гистологическое строение опухоли в группе контроля

Примечание: клетки опухоли разделены тонкими прослойками соединительной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 246,4х.

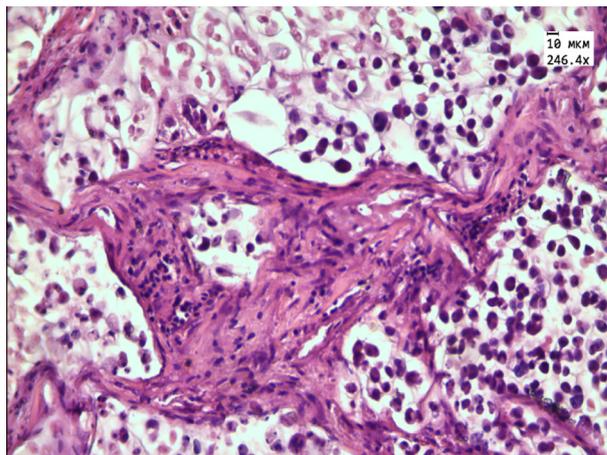


Рисунок 2 – Гистологическое строение перевиваемого рака печени в группе, получавшей спиртовой экстракт тимьяна Маршалла

Примечание: дистрофические и некротические изменения опухолевых клеток, «клетки-тени» (черная стрелка), утолщение соединительнотканых перегородок (белая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 246,4х.

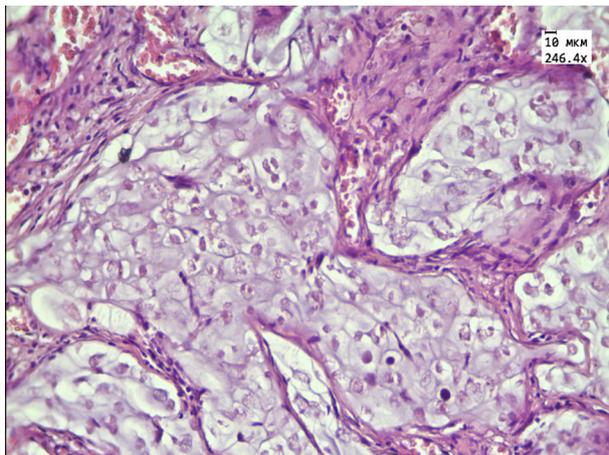


Рисунок 3 – Гистологическое строение перевиваемого рака печени в группе, получавшей водный экстракт тимьяна Маршалла

Примечание: очаги некроза опухолевой ткани (черная стрелка), утолщение соединительнотканых перегородок (белая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 246,4х.

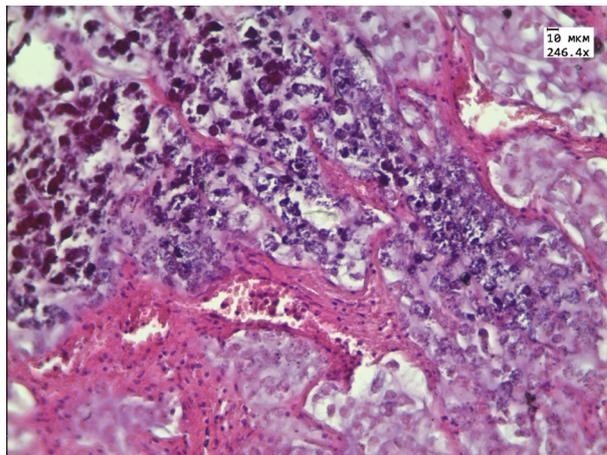


Рисунок 4 – Гистологическое строение перевиваемого рака печени в группе, получавшей водный экстракт тимьяна Маршалла

Примечание: Конденсация ядерного хроматина и кариорексис в опухолевых клетках (белая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 246,4х.

Таблица 1 – Динамика изменения объема перевиваемой опухоли крыс РС-1 и истинной массы тела экспериментальных животных

Группа	Группа контроля	Спиртовой экстракт	Водный экстракт	p*	p**
		тимьяна	тимьяна		
Показатель		Me (LQ; UQ) [min-max]			
Объем опухоли	11087; (3678–22210); [162–62350]	15150; (4863,5–20736); [180–95040]	9948; (3072–19941); [160–49910]	0,583	0,329
Изменение истинной массы тела животных	6,53; (3,7–6,9); [–5,7–11,5]	0,7; (–2,1–8,7); [–3,1–9,4]	15,4; (11,3–16,4); [8,0–20,7]	0,000	0,037

Примечание: Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль; [min-max] – минимальное и максимальное значение определяемого признака; P* – значимость различий между группами оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса; P** – значимость различий между двумя экспериментальными группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Таблица 2 – Морфометрические показатели клеток перевиваемого рака печени

Группа	Группа контроля	Спиртовой экстракт тимьяна		Водный экстракт тимьяна	p*	p**
		Me (LQ; UQ) [min-max]				
Количество клеток в поле зрения	90 (82–96); [68–123]	39 (34–47); [24–64]	11 (9–15); [6–18]	0,000	0,000	
Количество некротизированных клеток	1 (1–2); [0–4]	20,05 (11–34); [7–47]	42 (38–44); [28–54]	0,000	0,000	
Диаметр опухолевой клетки	14 (13–15); [12–21]	7 (6–8) [6–12]	7 (6–8); [6–10]	0,000	0,065	
Диаметр ядра опухолевой клетки	8 (7–9); [6–10]	3 (3–4) [2–5]	3 (2–3); [2–3]	0,000	0,000	
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0,6 (0,5–0,6); [0,5–0,8]	0,43 (0,38–0,5); [0,3–0,83]	0,38 (0,33–0,43); [0,2–0,5]	0,001	0,001	

Примечание: Me – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль; [min-max] – минимальное и максимальное значение определяемого признака; P* – значимость различий между группами оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса; P** – значимость различий между двумя экспериментальными группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

При морфологическом и морфометрическом изучении ткани опухоли в группе крыс, получавших спиртовой экстракт тимьяна, обращал на себя внимание выраженный патоморфоз преимущественно в центральных отделах опухоли, где отмечалось большое количество «клеток-теней», уменьшение размеров опухолевых клеток, обширные зоны некроза. Остаточные клетки опухоли представлены мелкими округлыми клетками с ядрами округлой или бобовидной формы, с единичными мелкими вакуолями, содержащими слизь. Клетки опухоли расположены в ячейках, образованных утолщенными соединительнотканскими перегородками с большим количеством тонкостенных полнокровных сосудов. Волокна соединительной ткани инфильтрированы лимфоцитами. Митоз определяли лишь в одном случае наблюдения (рис. 2).

В группе крыс, получавших водный экстракт тимьяна, опухоль представлена мелкими округлыми клетками с уменьшенным в размерах уплощенным ядром, расположенными по периферии ткани опухоли. Центральные отделы при этом представлены обширными очагами некроза, большим количеством «клеток-теней» и утолщенными соединительнотканскими перегородками с большим количеством полнокровных сосудов, а также обширными скоплениями опухолевых клеток с признаками апоптоза – кариопикноза, конденсации ядерного хроматина и кариорексиса, большим количеством апоптотических телец (рис. 3, 4).

При морфометрическом исследовании определяли снижение среднего числа сохранных опухолевых клеток в поле зрения в 2,2 раза в группе крыс,

получавших спиртовой экстракт тимьяна, и в 7,8 раза в группе крыс, получавших водный экстракт, по сравнению с группой контроля.

Уменьшение размера опухолевых клеток в 2 раза, по сравнению с группой контроля, отмечали в обеих опытных группах. Так в группе крыс, получавших спиртовой экстракт тимьяна, средний диаметр опухолевой клетки был в 1,86 раза, а в группе крыс, получавших водный экстракт, в 1,99 раза меньше по сравнению с группой контроля. Кроме того, отмечалось уменьшение и диаметра ядра опухолевых клеток, а также уменьшение значений ядерно-цитоплазматического соотношения как в группе животных, получавших спиртовой экстракт (0,43), так и получавших водный экстракт тимьяна (0,38) по сравнению с группой контроля (0,6) (табл. 2).

Ранее Kubatka P. с соавт., было проведено изучение противоопухолевой активности *Thymus vulgaris* L. на моделях карциномы молочной железы *in vivo* [16]. В эксперименте проведено изучение химиопрофилактики (модель NMU-индуцированного канцерогенеза молочной железы на самках крыс) и терапевтического применения (модель аденокарциномы 4T1 на самках мышей). Животным вводили в рацион гранулы травы тимьяна обыкновенного (траву измельчали до частиц размером 2 мм и обрабатывали с помощью «процедуры холодного гранулирования») в двух концентрациях 1 г/кг и 10 г/кг. Крысам гранулы начинали давать за неделю до введения канцерогена и продолжали до 15-ти недель эксперимента, а мышам – со дня инокуляции клеток карциномы и до 15-ти дней. Потребление пищи во время эксперимента в течение 24-х часов отслеживали четыре раза

у крыс и дважды у мышей. Средняя суточная доза тимьяна обыкновенного на крысу составила 16,27 мг (тимьян 1 г/кг) и 172,00 мг (тимьян 10 г/кг), а на мышью – 2,06 мг (тимьян 1 г/кг) и 15,13 мг (тимьян 10 г/кг). Тимьян обыкновенный в дозе 10 г/кг значительно ингибировал образование карциномы молочной железы у крыс на 53% по сравнению с контролем, но латентность опухоли и ее средний объем существенно не изменились. Химиопрофилактическая эффективность (частота опухолей), наблюдаемая в этой группе крыс, значимо коррелировала с уменьшением опухолей, то есть было отмечено небольшое количество новых опухолей, которые росли дольше. Тимьян обыкновенный в дозе 1 г/кг не показал каких-либо значительных изменений по сравнению с контролем. У мышей, получавших тимьян обыкновенный, объем опухолей был значительно меньше в двух экспериментальных группах по сравнению с контролем: на 85% в группе, получавшей гранулы в концентрации 1 г/кг и на 84% в группе, получавшей гранулы в концентрации 10 г/кг. Более того, у мышей тимьян обыкновенный в обеих дозах достоверно уменьшал соотношение некроза ко всей площади опухоли – на 77% (тимьян 1 г/кг) и 81% (тимьян 10 г/кг) по сравнению с контролем, а также индекс митотической активности – на 31,5% (тимьян 1 г/кг) и 25% (тимьян 10 г/кг) по сравнению с контролем при аденокарциномах.

В нашем эксперименте *in vivo*, проведенном на крысах, был использован альвеолярный рак печени РС-1. Животным внутривенно вводили экстракты из травы тимьяна Маршалла в дозе 100 мг/кг (0,1 г/кг) в течение 14-ти дней после достижения опухолью 1 см³, то есть нами проведено изучение эффективности терапевтического применения экстрактов тимьяна Маршалла. В статье Kubatka P. с соавт., не отмечено общее состояние животных (изменение веса животных, аппетита), что не позволяет сравнить антикахектическую активность гранул тимьяна обыкновенного и изученных нами экстрактов тимьяна Маршалла. Следует отметить, что в этом эксперименте при канцерогенезе молочной железы у крыс, индуцированном хемоканцерогеном, гранулы тимьяна обыкновенного в дозе 10 г/кг значительно снизили частоту возникновения опухолей (на 53%). Это доказывает эффективность их применения в качестве химиопрофилактического средства. С помощью данной экспериментальной модели трудно оценить ключевые параметры терапевтического эффекта (объем опухоли), так как у крыс с эффективной химиопрофилактикой было относительно небольшое количество новых опухолей по сравнению с контрольной группой. Модель трансплантации карциномы мышам [16], как и в нашем эксперименте, позволяет оценить терапевтический эффект исследуемых веществ, так как их действие направлено против существующих раковых клеток. В нашем эксперименте показано, что объем опухолей у крыс опытных групп изменялся так

же, как и в контрольной группе, однако при гистологическом анализе опухолей животных, получавших экстракты в дозе 100 мг/кг. Нами выявлено снижение количества сохранных опухолевых клеток в поле зрения, выраженные некробиотические и атрофические изменения клеток опухоли, отсутствие митозов, разрастание соединительнотканых волокон, за счет которых, вероятно, объем опухолей не уменьшался. При этом водный экстракт тимьяна Маршалла проявил более выраженный противоопухолевый эффект, так как при его введении выявлены морфологические признаки апоптоза.

В эксперименте Kubatka P. с соавт. [16], объем опухолей у мышей, получавших гранулы тимьяна обыкновенного в двух исследуемых дозах (1 г/кг и 10 г/кг), был меньше, чем в контрольной группе. Описанные авторами результаты продемонстрированы несколькими механизмами противоопухолевого действия, изученными в эксперименте, – проапоптотический, антипролиферативный, антиангиогенный, антиоксидантный [16]. Таким образом, наш эксперимент и исследование Kubatka P. с соавт. [16] продемонстрировали значительную противораковую активность *in vivo* представителей рода тимьян (*тимьяна Маршалла* и *тимьяна обыкновенного*), но, несмотря на то, что эти виды являются близкородственными, характер проявляемых эффектов разный. Можно предположить, что разное изменение объема опухолей и разный характер структурных изменений опухоли у животных в двух экспериментах обусловлены различной чувствительностью раковых клеток *in vivo* к фитохимическим веществам, вариабельностью химического состава исследуемых видов растений, а также зависимостью от дозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, динамика роста объема опухолей под влиянием как спиртового, так и водного экстрактов тимьяна Маршалла, была сопоставима с измерениями в контрольной группе (достоверных отличий от контроля не установлено). При этом в обеих опытных группах, получавших экстракты тимьяна, наряду с некротическими изменениями отмечается разрастание волокон соединительной ткани, что, вероятно, объясняет недостоверность изменений объема опухолевых образований в этих группах.

Морфологический анализ ткани опухоли показал противоопухолевую активность как спиртового, так и водного экстрактов травы тимьяна Маршалла о чем свидетельствуют снижение количества сохранных опухолевых клеток в поле зрения, выраженные некробиотические и атрофические изменения клеток опухоли, отсутствие митозов, разрастание соединительнотканых волокон, что соответствует II-III степени патоморфоза опухоли [27]. Следует отметить, что водный экстракт тимьяна Маршалла проявил более сильную противоопухолевую активность, так как при

его введении выявлены морфологические признаки апоптоза: появление апоптотических телец, кареопикноз и конденсация ядерного хроматина в опухолевых

клетках. Можно предположить, что более выраженный противоопухолевый эффект водного экстракта обусловлен большим выходом флавоноидов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансирования от сторонних организаций

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.С. Шереметьева – сбор растительного материала для эксперимента, проведение эксперимента и сбор данных, анализ и интерпретация полученных данных, статистическая обработка полученных результатов, анализ литературы, написание рукописи; А.М. Напшева – анализ и интерпретация полученных данных, статистическая обработка полученных результатов, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи; Н.А. Дурнова – планирование исследования, участие в разработке концепции и дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Турсунова Н.В., Чуринов Б.В., Клиникова М.Г. Противоопухолевая активность соединений природного происхождения // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 5. – С. 201–201.
2. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Семенов А.А., Жапова Ц., Погодаева Н.Н., Хоруужая Т.Г. Исследование противоопухолевых и антимиастатических свойств растительных средств из аконита байкальского // Сибирский онкологический журнал. – 2002. – № 3–4. – С. 138–141.
3. Приходченко Т.Р., Актентьева Н.П., Немирова Е.С., Гизатуллин А.Р., Шкондина Н.И. Изучение противоопухолевой активности растительных экстрактов (*Kalanchoe daigremontiana*, *Aloe arborescens*) на клетках множественной миеломы // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17, № 5. – С. 59–60.
4. Винокурова О.А., Тринева О.В., Сливкин А.И. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 4. – С. 134–50.
5. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А., Лапина Е.С. Тимьян Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd.) – источник пектиновых веществ // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1–7. – С. 1139–1141.
6. Sevastre-Berghian A.C., Ielciu I., Mitre A.O., Filip G.A., Oniga I., Vlase L., Benedec D., Gheldiu A.M., Toma V.A., Mihart B., Mihuț A., Bâldea I., Olteanu D., Chis I.C., Clichici S.V., Hanganu D. Targeting Oxidative Stress Reduction and Inhibition of HDAC1, MECP2, and NF-κB Pathways in Rats With Experimentally Induced Hyperglycemia by Administration of *Thymus marshallianus* Willd. Extracts // Front Pharmacol. – 2020. – No.11. – Art. No.581470. DOI: 10.3389/fphar.2020.581470.
7. Шереметьева А.С., Фролова А.В., Дурнова Н.А. Влияние условий экстракции на качественный состав извлечений из травы тимьяна Маршалла. Гармонизация подходов к фармацевтической разработке. Сб. тезисов III Междунар. Науч.-практ. конф. Рос. Ун-тет дружбы народов. – Москва, 2020. – С. 133–136.
8. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Аминокислотный и минеральный состав травы тимьяна Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd.) // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2012. – № 6–1. – С. 214–216.
9. Старчак Ю.А., Бубенчикова В.Н. Жирнокислотный и углеводный состав травы тимьяна Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd.) // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2014. – Т. 1, № 7. – С. 221–222.
10. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А., Попова Н.В. Анализ гидроксикоричных кислот в траве тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2014. – № 4. – С. 28–31.
11. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А., Безъязычная А.А. Карбоновые кислоты травы тимьяна Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd.) // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2–15. – С. 3316–3318.
12. Afonso A.F., Pereira O.R., Cardoso S.M. Health-promoting effects of *Thymus* phenolic-rich extracts: Antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral properties // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9, No.9. – P. 814–834. DOI: 10.3390/antiox9090814.
13. Rezzoug M., Bakchiche B., Gherib A., Roberta A., Kiliñarçlan Ö., Mammadov R., Bardaweel S.K. Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. Reut. from the Algerian Saharan Atlas // BMC complementary and alternative medicine. – 2019. – Vol.19, No.1. – P. 1–10. DOI: 10.1186/s12906-019-2556-y.
14. Patil S.M., Ramu R., Shirahatti P.S., Shivamallu C., Amachawadi R.G. A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. // Heliyon. – 2021. – Vol. 7, No.5. – P. e07054. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07054.
15. Niksic H., Becic F., Koric E., Gusic I., Omeragic E., Muratovic S., Duric K. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, No.1. – P. 1–9. DOI: 10.1038/s41598-021-92679-x.
16. Kubatka P., Uramova S., Kello M., Kajo K., Samec M., Jasek

- K., Vybohova D., Liskova A., Mojzis J., Adamkov M., Zubor P., Smejkal K., Svajdlenka E., Solar P., Samuel S.M., Zulli A., Kassayova M., Lasabova Z., Kwon T.K., Pec M., Danko J., Büsselberg D. Anticancer activities of *Thymus vulgaris* L. in experimental breast carcinoma in vivo and in vitro // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, No.7. – P. 1749. DOI: 10.3390/ijms20071749.
17. Heidari Z., Salehzadeh A., Shandiz S.A.S., Tajdoost S. Anti-cancer and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8, No.3. – P. 1–14. DOI: 10.1007/s13205-018-1199-x.
 18. Балакина А.А., Кузьмина Е.А., Древова А.Н., Мубарак М.М., Карсункина Н.П., Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю. Оценка цитотоксического действия экстрактов из лекарственных растений на клеточную линию M HeLa // Вестник Рязанского государственного агротехнического университета имени П.А. Костычева. – 2015. – Т. 4, № 28. – С. 127–131.
 19. Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R., Karaca B. Effects of *Thymus serpyllum* extract on cell proliferation, apoptosis and epigenetic events in human breast cancer cells // Nutrition and cancer. – 2012. – Vol.64, No.8. – P. 1245–1250. DOI: 10.1080/01635581.2012.719658.
 20. Скворцова И.В., Березуцкий М.А. Флора железнодорожных насыпей южной части Приволжской возвышенности // Поволжский экологический журнал. – 2008. – № 1. – С. 55–64.
 21. Кусова Р.Д. Исследование флавоноидов и оксикоричных кислот в траве *Thymus marschallianus* Willd. // Ежемесячный научный журнал. – 2014. – № 2. – С. 142–144.
 22. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Изучение отхаркивающей активности растений рода тимьян // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 5. – С. 78–80.
 23. Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Березуцкий М.А. Содержание эфирных масел в траве разных видов рода тимьян (*Thymus* L.) // Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета. – 2017. – Т. 15, № 2. – С. 15–19.
 24. Polukonova N.V., Navolokin N.A., Durnova N.A., Masljakova G.N., Bucharskaja A.B, inventors; Polukonova N.V., Navolokin N.A., proprietors. Method for preparing dry extract of herbal raw material possessing biological activity. – RU 2482863. – 2012.
 25. Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Райкова С.В. Исследование антимикробной активности водно-спиртового экстракта тимьяна Маршалла // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. Москва. – 2019. – С. 509–514.
 26. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Оценка противоопухолевой и антикахектической активности экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) у крыс с перевитой саркомой // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 37–43. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-1-37-43.
 27. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Учение Я.Л. Рапопорта о патоморфозе: прошлое и настоящее // Архив патологии. – 2013. – № 4. – С. 62–66.

АВТОРЫ

Шереметьева Анна Сергеевна – старший преподаватель кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0022-8318. E-mail: anna-sheremeteyewa@yandex.ru

Напшева Анета Мухамедовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского»

Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7471-4335. E-mail: a.napsheva@yandex.ru

Дурнова Наталья Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, зав. кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4628-9519. E-mail: ndurnova@mail.ru