

© Коллектив авторов, 2004

С. А. Федореев<sup>1</sup>, Н. И. Кулеш<sup>1</sup>, Л. И. Глебо<sup>1</sup>, Т. В. Покушалова<sup>1</sup>,  
М. В. Веселова<sup>1</sup>, А. С. Саратиков<sup>2</sup>, А. И. Венгеровский<sup>2</sup>, В. С. Чучалин<sup>2</sup>

## ПРЕПАРАТ МАКСАР ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РАСТЕНИЯ МАОКИ АМУРСКОЙ

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск

В течение последних лет в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН проводился поиск природных антиоксидантов среди представителей дальневосточных растений. В результате выявлен ряд перспективных видов, содержащих антиоксиданты полифенольной природы. Наибольший интерес среди видов этих растений вызывает маакия амурская. Ее экстрактивные вещества обладают выраженными антиоксидантными свойствами и низкой токсичностью, что побудило исследовать их в качестве гепатопротекторов при токсических поражениях печени. На основе полифенольного комплекса маакии амурской создан гепатопротективный препарат “максар” (аббревиатура фамилий руководителей коллективов-разработчиков О. Б. Максимова и А. С. Саратикова), который по активности превосходит известные гепатопротекторы: легалон, силибор и др. [1 – 4].

М. амурская (*Maackia amurensis* Rupr et Maxim.) — единственный древесный представитель сем. бобовые *Fabaceae* во флоре российского Дальнего Востока. Вероятно, этот вид можно считать реликтом третичной флоры, который сохранился в более суровых климатических условиях, чем виды родов *Cladrastis* и *Sophora*. М. амурская распространена в бассейне реки Амур и на юге Приморского края. Естественные запасы этого растения велики и активно самовозобновляются [5]. В Корее и Японии широко распространен близкий вид маакии (*M. amurensis* Rupt. et Maxim. var. *buergeri* (Maxim.) С. К. Schneider). Однако его химический состав резко отличен от состава дальневосточного вида *M. amurensis* [6, 7].

**Химический состав препарата.** До 1985 г. единственными данными о химическом составе российской маакии были сведения об алкалоидах, содержащихся в коре и зеленых частях растения, и лектинах семян и коры. При последующем детальном химическом исследовании спиртовых экстрактов ядровой древесины нами было показано, что основными компонентами маакии являются растительные полифенолы, составляющие полифенольный комплекс препарата максар [5, 6]. К ним относятся изофлавоны: генистеин (I), даидзеин (II), ретузин (III), афромозин (IV), формонетин (V), оробол (VI), текторигенин (VII), 3-гидроксивеститон (VIII), птерокарпаны: маакиин (IX), медикарпин (X) [7 – 10]. Свообразием м. амурской, произрастающей в Приморье, является высокое содер-

жание в ее древесине мономерных стильбенов резвератрола (XI) и пицеатаннола (XII), а также изофлавоностильбена маакиазина (XIII) [9]. Эти полифенолы не были найдены у разновидности м. амурской (var. *buergeri*), произрастающей в Японии [5]. Кроме мономерных стильбенов и изофлавонов, полярные фракции экстрактов маакии содержат олигомерные стильбены маакин (XIV), сцирпусин А (XV), сцирпусин В (XVI), маакин А (XVII) [11, 12] и стильбенолигнан мааколин (XVIII) [13] (рис. 1).

В процессе фракционирования экстрактов м. амурской на обратнофазных сорбентах был выделен и идентифицирован методами ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии ряд димерных стильбенов, имеющих *цис*-конфигурацию двойной связи. Однако впоследствии нами было показано, что *цис*-изомеры не являются нативными компонентами древесины маакии, а образуются из *транс*-димерных стильбенов в кислых водно-спиртовых растворах с УФ-детекцией в проточной кювете [11, 12]. Таким образом, ныне известные химические компоненты ядровой древесины м. амурской состоят из представителей различных классов полифенолов, из которых главными являются изофлавоноиды, мономерные и димерные *транс*-стильбены. Большинство фенольных компонентов, выделенных из м. амурской, обладает высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью, сопоставимой с эффектом ионола [8, 14].

Для исследования путей биосинтеза этих полифенолов были получены клеточные культуры, приготовленные из побегов, черешков, цветковой кисти, почек, корней м. амурской. В результате проведенных экспериментов было установлено, что клеточные культуры из различных частей м. амурской продуцируют одинаковый набор изофлавонов и птерокарпанов: даидзеин, ретузин, генистеин, формонетин, маакиин и медикарпин. Количественное содержание изофлавонов и птерокарпанов в клеточных культурах, полученных из различных частей растения, отличалось и зависело от методов культивирования, состава питательных сред, присутствия биосинтетических предшественников и регуляторов роста. После длительного культивирования первичных каллусов были получены штаммы клеточных культур м. амурской, синтезирующие значительные количества изофлавонов и птерокарпанов. Максимальное содержание суммы мономерных полифено-

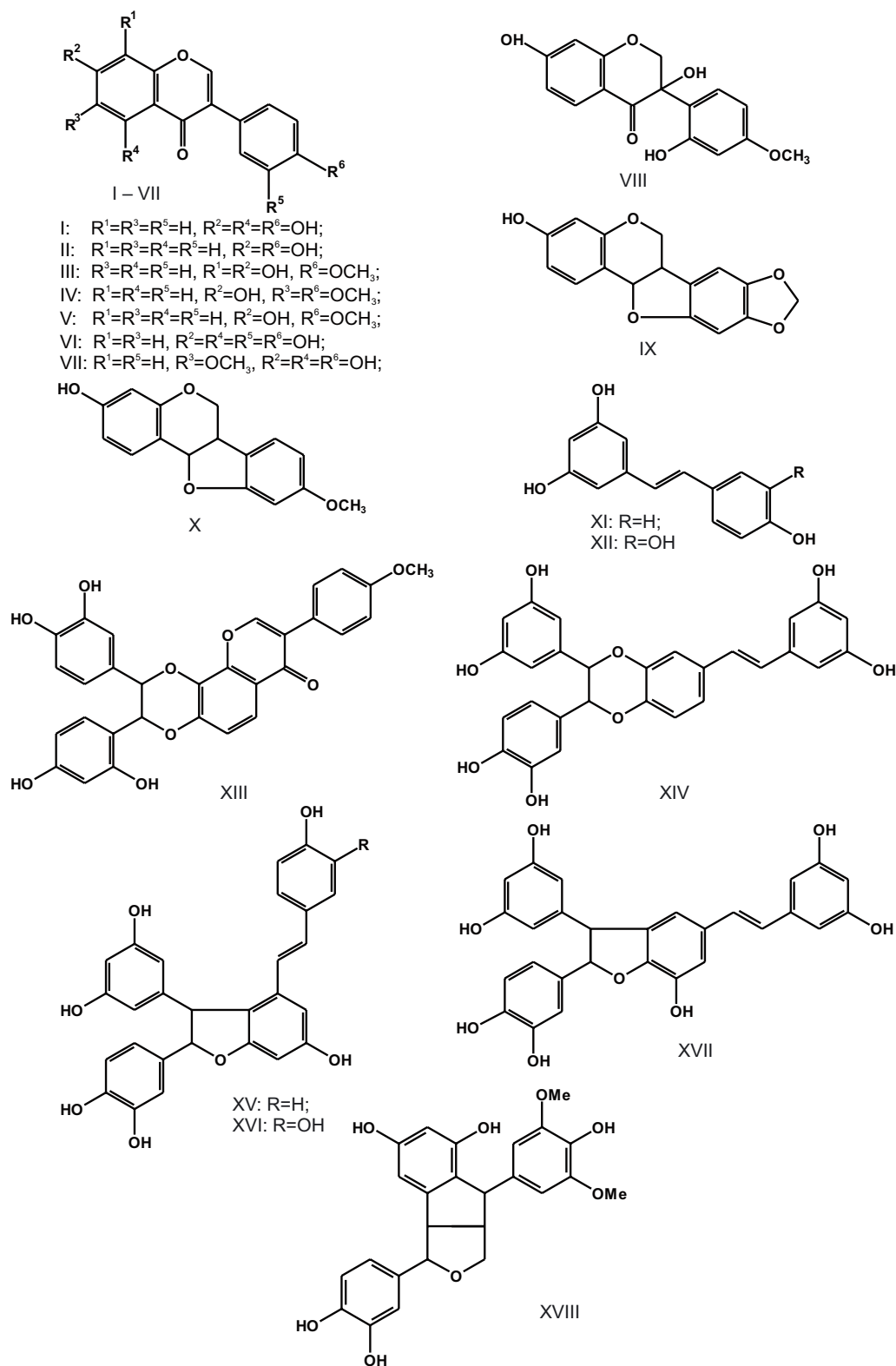
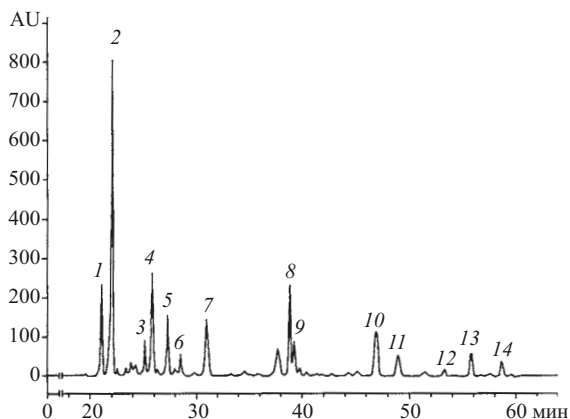


Рис. 1. Полифенолы ядровой древесины мааки амурской

лов в сухой массе клеток составило 2,08 % [15], тогда как содержание их в ядровой древесине растения осенью достигает 1,57 – 1,83 % [16, 17]. В отличие от нативного растения ни одна из полученных клеточных культур не продуцирует стильбены и димерные стильбены [15].

**Стандартизация препарата максар.** Субстанцию для препарата максар получали из экологически чист-

того сырья — ядровой древесины мааки амурской. По внешнему виду она представляет собой порошок темно-коричневого цвета с блеском, слабым смолистым запахом, характерным для сырья; имеет способность к комкованию. Максар чувствителен к свету. Это свойство препарата обусловлено наличием в его составе таких химически активных соединений, как стильбены и их димерные производные, которые под действи-



**Рис. 2.** ВЭЖХ-хроматограмма бензольно-ацетоновой фракции препарата максар, снятой с силикагелевой колонки: 1 — ГСО дигидрокверцетина, 2 — пицеатаннол, 3 — 3-гидроксивеститон, 4 — резвератрол, 5 — даидзеин, 6 — оробол, 7 — ретузин, 8 — генистеин, 9 — текторигенин, 10 — формонетин, 11 — афромозин, 12 — маакиаин, 13 — медикарпин, 14 — маакиазин.

ем света, особенно при повышенной влажности, могут претерпевать различные химические превращения.

Для установления подлинности субстанции и препарата максар использовали методики ТСХ- и ВЭЖХ-определения веществ, специфичных для этих препаратов. На ТСХ-хроматограммах регистрировали количество пятен, их окраску и положение ( $R_f$ ) на пластинке; на ВЭЖХ-хроматограмме — относительные времена удерживания (ОВУ) веществ по сравнению с временем удерживания внутреннего стандарта, в качестве которого использовали ГСО дигидрокверцетина. В обеих методиках хроматографированию подвергали растворы препаратов, приготовленные для количественного определения.

Расшифровку ТСХ- и ВЭЖХ-хроматограмм, определение  $R_f$  и ОВУ веществ осуществляли с помощью модельных соединений и их смесей, а также использовали “метод добавок”. На ТСХ-хроматограммах четко проявляются три пятна, принадлежащие генистеину, резвератролу и пицеатаннолу; на ВЭЖХ-хроматограмме (рис. 2) регистрируются не менее 14 пиков, из которых для подтверждения подлинности препаратов выбрали 5 пиков основных веществ, принадлежащих пицеатаннолу, резвератролу, ретузину, генистеину и формонетину. Применение этих двух методов хроматографии дает возможность однозначно решить вопрос о подлинности препаратов.

Стандартизацию субстанции и препарата максар проводили по количественному содержанию основных действующих веществ — мономерных фенолов (по общей сумме стильбенов и изофлавонов). Для этого нами разработана спектрофотометрическая методика [18], основанная на выделении суммы мономерных фенолов в виде элюата с помощью колонки с силикагелем в сочетании с системой растворителей бензол — ацетон и последующим измерением собственного поглощения суммы изофлавонов и суммы стильбенов при двух длинах волн.



**Рис. 3.** Микроскопия древесины м. амурской. а — Фрагмент продольнотангентального среза древесины, видны сосуды со спиральнопористым утолщением, веретеновидный сердцевинный луч и волокна либриформа. б — Фрагмент поперечного среза древесины у границы двух годовичных слоев, в поздней древесине видны волокна либриформа, узко-просветные сосуды; в ранней древесине последующего года — часть широких просветов сосудов; сердцевидные лучи расширены на границе годовичных слоев

Условия выделения мономерных фенолов установлены в опытах с субстанцией и препаратом максар, а также на модельных смесях индивидуальных соединений с визуальным (ТСХ) и количественным (ВЭЖХ) контролем [17, 18]. Условия ВЭЖХ-хроматографирования: колонка (250 × 4 мм), заполненная сорбентом Hypersil ODS, 5 мкм; градиентное элюирование: раствор 2 % уксусной кислоты (100 → 60 %) —  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0 → 40 %), скорость потока — 1 мл/мин,  $\lambda$  — 282 нм.

На ВЭЖХ-хроматограмме (рис. 2) бензольно-ацетоновой фракции препарата максар, снятой с силикагелевой колонки, видно, что фракция содержит, в основном, мономерные фенолы: стильбены (пицеатаннол, резвератрол) и изофлавоны (3-гидроксивеститон, даидзеин, оробол, ретузин, генистеин, текторигенин, формонетин, афромозин, маакиаин, медикарпин и маакиазин). Следовательно, с помощью силикагелевой колонки и предложенной системы растворителей достигается оптимальное отделение суммы стильбенов и изофлавонов от олигомерных полифенолов, что позволяет применить прямое спектрометрирование элюата.

При изучении УФ-спектров спиртовых растворов индивидуальных веществ, входящих в состав бензольно-ацетоновой фракции, были обнаружены изобестиические точки (длины волн) для группы изофлавонов

(272 нм) и группы стильбенов (320 нм), при которых интенсивность полос поглощения для равных концентраций растворов примерно одинаковая. На основании полученных результатов были рассчитаны удельные коэффициенты поглощения  $E_{1\text{см}}^{1\%}$  для каждой группы веществ.

Содержание стильбенов ( $X_1$ ) и изофлавонов ( $X_2$ ) в расчете на сухую субстанцию, в процентах, вычисляли по формулам:

$$X_1 = \frac{D_2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{^1 E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot (100 - W)},$$

$$X_2 = \frac{D_2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{^2 E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где  $m$  — навеска субстанции в граммах;  $D_1$  — оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 320 нм;  $D_2$  — оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 272 нм;  $^1 E_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения суммы стильбенов при длине волны 320 нм;  $^2 E_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения суммы изофлавонов при длине волны 272 нм;  $W$  — потеря в массе при высушивании анализируемой пробы в процентах.

Кроме этого, нами модифицированы известные методы определения тяжелых металлов, мышьяка и других показателей [19] применительно к сырью, субстанции и препарату максар. Исследована стабильность сырья, субстанции и препарата и определены сроки их годности. Установлены ограничительные нормативы содержания примесей и остаточного растворителя. Разработана оптимальная лекарственная форма препарата максар: Максар® таблетки, покрытые оболочкой, 60 мг. Для определения диагностических признаков цельного сырья были получены микрофотографии древесины на поперечном и продольных срезах (рис. 3, а, б).

**Фармакологические свойства.** Специфическая фармакологическая активность максара исследована в объеме требований Фармакологического комитета МЗ РФ к доклиническому изучению гепатопротекторов. В эксперименте препарат препятствует развитию острого гепатита, вызванного гепатотоксинами с различным механизмом повреждающего эффекта (тетрахлорметан, парацетамол, D-галактозамин, аллиловый спирт). В эксперименте гепатопротективное действие максара более выражено, чем влияние легалона. Результатами лечения максаром (200 мг/кг) острого токсического гепатита являются: отсутствие гибели животных (в контроле выживаемость составляла 67–90 %), нормализация структуры печеночных долек, защита паренхимы печени от колликвационного некроза, белковой и жировой дистрофии. Максар препятствует развитию характерных для токсического гепатита нарушений ультраструктуры гепатоцитов — расширению и превращению в вакуоли канальцев эндоплазматического ретикулума, отрыву рибосом от его мембраны, набуха-

нию и деформации митохондрий, образованию аутофаголизосом. У леченых максаром животных сохраняется нормальная активность органеллоспецифических ферментов митохондрий (сукцинат-, малат-,  $\beta$ -оксидированная тиратдегидрогеназы), ЭПР (глюкозо-6-фосфатаза) и лизосом (кислая фосфатаза), в крови нормализуется активность печеночноспецифических ферментов — урокиназы, лактатдегидрогеназы, фосфолипазы  $A_1$ , аминотрансфераз [1–4, 20–23].

Гепатопротективный эффект максара обусловлен антиоксидантными свойствами полифенолов, способных нейтрализовать свободные радикалы в процессе обратимого окисления в хиноны. Полифенолы максара превращают гидроперекиси полиеновых жирных кислот в нетоксические оксикислоты с уменьшением продукции диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа и малонового диальдегида (МДА). В гепатоцитах потенцируется функция факторов эндогенной антиперекисной защиты — витамина Е, восстановленного глутатиона и глутатионзависимых ферментов [3, 4].

Максар, как активный антиоксидант и ингибитор фосфолиполиза, препятствует деструкции фосфолипидов в детергентные лизофосфатиды, воссоздает фосфолипидное микроокружение цитохрома Р-450 в мембране ЭПР. При токсической гепатодепрессии, вызванной прооксидантами, “суицидными” субстратами цитохрома Р-450 — тетрахлорметаном и парацетамолом, а также ингибитором синтеза белка D-галактозамин, терапия максаром приводит к улучшению антиоксидантной функции печени. Максар предохраняет цитохром Р-450 от конверсии в метаболически инертный цитохром Р-420, восстанавливает нормальное течение реакций окисления и глюкуронирования. У интактных животных максар проявляет свойства индуктора цитохрома Р-450 [2, 22].

При экспериментальном хроническом гепатите, вызванном тетрахлорметаном, максар, подавляя стимулированный продуктами липопероксидации синтез коллагена и гликозаминогликанов, сдерживает формирование фиброза внутри печеночных долек. Препарат оказывает также антинекротическое и противовоспалительное действие [24].

Желчегонное влияние максара, превосходящее эффект фламина, развивается как у интактных крыс, так и на фоне угнетения холеретической функции печени при  $CCl_4$ -гепатите. Однократное и в большей степени курсовое введение максара интактным животным приводит к значительному ускорению секреции желчи, росту экскреции билирубина, холестерина и желчных кислот. При интоксикации тетрахлорметаном терапия максаром сопровождается не только устранением нарушений желчеобразования, но и стимуляцией секреторной функции печени выше уровня нормы [3].

При остром экспериментальном панкреатите, воспроизведенном с помощью орошения поджелудочной железы белых крыс струей хлорэтила, максар оказывал прямое терапевтическое влияние на поврежденную поджелудочную железу и улучшал метаболизм

печени. Препарат защищал от гибели экспериментальных животных, снижал активность ферментов-маркеров деструкции поджелудочной железы ( $\alpha$ -амилаза, липаза) и печени (аминотрансферазы, фосфатазы), препятствовал удлинению гексеналового сна, ускорял элиминацию бромсульфалеина, сдерживал прогрессирование гипербилирубинемии, гипергликемии и гипопротейнемии, повышал амилазо-креатининовый клиренс. В поджелудочной железе и печени максар уменьшал содержание ДК и продукцию МДА [25].

Максар характеризуется малой острой и хронической токсичностью, лишен мутагенного, эмбриотоксического, тератогенного, иммунотоксического и аллергизирующего эффектов.

Клинические исследования максара проведены на кафедрах клинической фармакологии Московской медицинской академии и терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Сибирского государственного медицинского университета (Томск). У больных хроническим гепатитом вирусной и алкогольной этиологии препарат способствовал уменьшению субъективных признаков заболевания (повышалась работоспособность, уменьшались боль и диспепсические расстройства). При этом снижались активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и содержание билирубина в крови; улучшались показатели печеночной структуры по данным ультразвукового исследования, показатели клеточного и гуморального иммунитета. Максар проявил себя как эффективное желчегонное средство, улучшающее экскреторную функцию печени, — у больных повышалось содержание в желчи билирубина, желчных кислот, холестерина, фосфолипидов. По клинической эффективности максар превосходил карсил. Побочные эффекты и противопоказания к применению не выявлены [26 – 28].

Кроме гепатопротективного действия, максар способствует коррекции нарушений липидного спектра фона крови и жировой дистрофии печени, повышает активность системы антиоксидантной защиты организма, препятствует развитию алиментарной гиперлипотеидемии у животных [29]. Он также оказывает антиоксидантное действие при экспериментальном сахарном диабете, индуцированном аллоксаном. Максар снижает интенсивность образования в печени продуктов перекисного окисления липидов (ДК, МДА, основания Шиффа), регулирует систему антиоксидантной защиты преимущественно через глутатионзависимые ферментативные механизмы и улучшает детоксикацию гидропероксидных радикалов [30].

На основании результатов клинической апробации Фармакологический государственный комитет МЗ РФ рекомендовал максар в качестве гепатопротектора для медицинского применения и промышленного выпуска. Проекты фармакопейных статей: “Маакии амурской древесины”, “Маакии амурской экстракт сухой”, “Максар® таблетки, покрытые оболочкой, 60 мг” прошли экспертизу Фармакопейного комитета МЗ РФ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 03-04-49515; № 03-04-48102 и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН (проект 03-1-0-05-006).

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Венгеровский, И. М. Седых, Т. В. Власова, А. С. Саратиков, *Раст. ресурсы*, № 3, 95 – 99 (1993).
2. А. И. Венгеровский, И. М. Седых, А. С. Саратиков, *Экспер. и клин. фармакол.*, **56**(5), 47 – 49 (1993).
3. Т. В. Власова, А. И. Венгеровский, А. С. Саратиков, *Хим.-фарм. журн.*, **28**(3), 56 – 59 (1994).
4. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, *Экспер. и клин. фармакол.*, **58**(1), 8 – 11 (1995).
5. О. Б. Максимов, Н. И. Кулеш, П. Г. Горовой, *Раст. ресурсы*, № 2, 157 – 163 (1992).
6. О. Б. Максимов, Н. И. Кулеш, Л. С. Степаненко, *Химия в интересах устойчивого развития*, **6**, 447 – 460 (1998).
7. M. Takai, H. Yamaguchi, T. Satton, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **20**(11), 2488 – 2490 (1972).
8. О. Б. Максимов, О. Е. Кривошекова, Л. С. Степаненко и др., *Химия природ. соед.*, № 6, 775 – 781 (1985).
9. О. Е. Кривошекова, Л. С. Степаненко, О. Б. Максимов, *Химия природ. соед.*, № 1, 39 – 42 (1986).
10. А. Н. Комиссаренко, В. Н. Ковалев, Н. Ф. Комиссаренко, *Химия природ. соед.*, № 3, 288 – 290 (1994).
11. Н. И. Кулеш, В. В. Исаков, О. Б. Максимов, *Химия природ. соед.*, № 5, 468 – 476 (1992).
12. Н. И. Кулеш, О. Б. Максимов, С. А. Федореев и др., *Химия природ. соед.*, № 5, 664 – 669 (1999).
13. N. I. Kulesh, V. A. Denisenko, O. B. Maksimov, *Phytochemistry*, **40**(3), 1001 – 1003 (1995).
14. О. Б. Максимов, П. Г. Горовой, Е. А. Кольцова и др., *Вестник ДВО РАН*, № 1, 40 – 50 (1996).
15. S. A. Fedoreyev, T. V. Pokushalova, M. V. Veselova, et al., *Fitoterapia*, **71**, 365 – 272 (2000).
16. Т. В. Покушалова, Л. И. Глебо, О. Б. Максимов, *Химия природ. соед.*, № 6, 801 – 804 (1988).
17. Т. В. Покушалова, Л. И. Глебо, Л. С. Степаненко и др., *Раст. ресурсы*, № 1, 555 – 558 (1990).
18. Т. В. Покушалова, Н. И. Кулеш, Л. И. Глебо, *Химия природ. соед.*, № 5, 440 – 441 (1992).
19. *Государственная фармакопея СССР*, XI изд., вып. 1, Москва (1987), с. 334.
20. А. И. Венгеровский, Н. О. Батурина, В. С. Чучалин, А. С. Саратиков, *Хим.-фарм. журн.*, **30**(2), 3 – 4 (1996).
21. А. И. Венгеровский, М. Ю. Коваленко, А. Г. Арбузов и др., *Раст. ресурсы*, вып. 3, 91 – 96 (1998).
22. Э. И. Белобородова, А. И. Венгеровский, А. С. Саратиков, *Сибир. ж. гастроэнтерологии и гепатологии*, № 10, 75 – 77 (2000).
23. О. Б. Максимов, Н. И. Кулеш, С. А. Федореев и др., Патент РФ 2104027; *Бюл. изобрет.*, № 4 (1998).
24. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, Н. О. Батурина, В. С. Чучалин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(1), 24 – 26 (1996).
25. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, М. Е. Мозжелин, И. В. Суходоло, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(12), 6 – 7 (2001).
26. Э. И. Белобородова, А. И. Венгеровский, Р. О. Гайсаев и др., *Сибирский жур. гастроэнтерологии и гепатологии*, № 8, 46 – 48 (1999).
27. Р. О. Гайсаев, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Томск (2000).
28. Р. О. Гайсаев, Э. И. Белобородова, А. С. Саратиков, Патент РФ 2175237; *Бюл. изобрет.*, № 30 (2001).
29. В. И. Янькова, Т. А. Гвозденко, И. Л. Иванова и др., *Бюл. экпер. биол.*, **134**(9), 267 – 270 (2002).
30. В. Я. Янькова, И. Л. Иванова, С. А. Федореев и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(4), 33 – 36 (2002).

Поступила 25.11.03.