



DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.2.14053>

УДК 615.3:576:577

## МЕХАНІЗМ ІНГІБУВАННЯ 15-ЛІПОКСИГЕНАЗИ ДІОСМІНОМ

В. І. Бессарабов, Н. П. Здерко

Київський національний університет технологій та дизайну  
[v.bessarabov@kyivpharma.eu](mailto:v.bessarabov@kyivpharma.eu)

### ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:  
18.03.2023

Після доопрацювання / Revised:  
30.03.2023

Прийнято до друку / Accepted:  
19.04.2023

### Ключові слова:

діосмін;  
флавоноїди;  
15-ліпоксигеназа;  
запалення;  
активний фармацевтичний  
інгредієнт;  
молекулярний механізм.

### АНОТАЦІЯ

**Мета роботи.** Дослідження протизапальних властивостей діосміну з використанням методу оцінки механізму інгібування 15-ліпоксигенази з сої (15-sLOX).

**Матеріали і методи.** Дослідження інгібування 15-sLOX діосміном проводили шляхом реєстрації утворення кон'югату при 234 нм із використанням спектрофотометричного методу. Як субстрат використовували лінолеву кислоту. Обробка експериментальних даних включала розрахунок стаціонарних швидкостей та кінетичних параметрів інгібування та проводилася згідно зі стандартними методиками, оцінку кінетики досліджуваного процесу проводили в програмі для аналізу та візуалізації даних SigmaPlot 14.0.

**Результати й обговорення.** Встановлено, що діосмін інгібує 15-ліпоксигеназу з  $IC_{50}=244,75\pm 19,91$  мкМ. При дослідженні механізму інгібування діосміном 15-sLOX встановлено, що найпридатнішою за критерієм значення коефіцієнта кореляції ( $R^2=0,97106$ ) є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування. Обраховані за обраною моделлю кінетичні константи для діосміну мають такі значення:  $K_i=66,14\pm 18,34$  мкМ;  $K_m=55,54\pm 5,86$  мкМ;  $V_{max}=0,98\pm 0,04$  мкМ/с.

**Висновки.** Встановлено, що діосмін є дозозалежним інгібітором 15-ліпоксигенази. Результати дають можливість розглядати вивчення *in vitro* інгібування 15-sLOX діосміном та речовинами подібної хімічної структури як ефективний спосіб досліджень протизапальних властивостей речовин на етапі доклінічних досліджень. Дані щодо механізму інгібування можуть бути використані при плануванні фармакологічних досліджень флавоноїдів та на первинних етапах фармацевтичної розробки нових лікарських засобів протизапальної дії.

**Вступ.** Пригнічення запалення є важливим напрямом коригуючої фармакотерапії захворювань різної етіології. Сьогодні фармацевтична промисловість виробляє протизапальні лікарські засоби різної хімічної структури та направленості дії. Однак всі вони мають побічні ефекти, від низької біодоступності до невисокої ефективності та руйнівної дії на слизові оболонки кишково-шлункового тракту. Тому дослідження нових активних фармацевтичних

інгредієнтів (АФІ) та плейотропних фармакологічних властивостей відомих АФІ з потенційною протизапальною дією є актуальним. Однією з таких речовин є діосмін – флавоноїд, який належить до поліфенольних сполук флавонової структури (5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one).

За кодом АТС діосмін входить до групи C05CA03 – ангіопротектори. Лікарські засоби цієї групи, що містять діосмін, застосовують для лікування симптомів венозно-лімфатичної недостатності. Комбінація діосміну і гесперидину має венотонізуючі та ангіопротективні властивості та зменшує взаємодію лейкоцитів та ендотелію, адгезію лейкоцитів у посткапілярних венулах. Це знижує пошкоджувальну дію медіаторів запалення на стінки і стулки клапанів вен [1–3].

Тому діосмін призначають пацієнтам із хронічними захворюваннями вен для підтримки здоров'я судин. Було доведено, що його застосування опосередковано покращує якість життя [4]. Діосмін також проявляє антиоксидантну активність і поглинає вільні радикали кисню, знижуючи рівні окиснювального стресу, які зазвичай виявляють за допомогою біомаркерів, таких, як попередники простагландинів [5].

Молекулярний механізм дії діосміну не встановлено. Однак у клінічному дослідженні показано, що середній рівень у сироватці крові таких медіаторів запалення, як TNF-альфа, VEGF-C, VEGF-A, IL-6, був знижений після терапії пацієнтів лікарським засобом на основі діосміну [4].

Загальні тенденції європейської дослідницької практики пов'язані з максимальним із можливо прийнятним переведенням досліджень фармакологічних властивостей АФІ з *in vivo* на *in vitro* (чи *ex vivo*). Тому доцільним є розробка методів дослідження протизапальних властивостей речовин без використання тварин. Одним із таких методів дослідження протизапальних властивостей є вивчення інгібування ензиму 15-ліпоксигенази. Інгібуючі ефекти 15-ліпоксигенази переважно оцінюють за допомогою 15-ліпоксигенази сої (15-sLOX) або 15-ліпоксигенази з ретикулоцитів кролика для аналізу *in vitro*. 15-sLOX зазвичай застосовували як модель людської 15-ліпоксигенази через подібність у структурі та механізмі взаємодії [6]. Використання методів *in vitro* дослідження властивостей потенційних АФІ є актуальним та віддає перевагу у пришвидшенні фармакологічної та фармацевтичної розробки нових протизапальних лікарських засобів.

**Мета роботи** – дослідження протизапальних властивостей діосміну з використанням методу оцінки механізму інгібування 15-sLOX.

**Матеріали і методи.** *Реагенти:* 15-ліпоксигеназа типу I-B з сої (15-sLOX) (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії 314-771-5750); кислота лінолева 99 % (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії U-59A); калію гідроксид (Укроргсинтез, Україна, номер партії R1626755); спирт етиловий 96 % (Медлев, Україна, номер партії 491220); диметилсульфоксид (ДМСО) 99 % (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії SZBG341SH); натрій фосфорнокислий 2-заміщений 12-водний (Merck, Німеччина, номер партії LN0705335); натрій фосфорнокислий 1-заміщений

2-водний (Merck, Німеччина, номер партії KA956576450); вода очищена I класу; діосмін (Chengdu Okay Pharmaceutical Co., LTD, Китай). *Дослідження інгібування ензиму in vitro.* Активність та ступінь інгібування 15-sLOX визначали шляхом реєстрації утворення кон'югату при 234 нм за допомогою спектрофотометричного методу (SPECORD 200 Plus, Analytik Jena, Німеччина). Як субстрат використовували лінолеву кислоту. Діосмін розчиняли в ДМСО і фільтрували через мембранний поліпропіленовий фільтр з діаметром пор 0,45 мкм (досліджуваний розчин). До реакційної суміші (загальний об'єм 2,5 мл), яка складалася з фосфатного буфера (pH 7,0) і 2,5 мМ лінолевої кислоти, додавали досліджуваний розчин у концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ. Реакцію ініціювали додаванням розчину 15-sLOX з концентрацією 0,65 мг/мл. Суміш інкубували при (25,0±0,1) °С впродовж 1,5 хв. Буфер використовували як порожній розчин. Було проведено сім вимірювань із використанням різних концентрацій субстрату в інкубаційній суміші для кожної з концентрацій досліджуваного розчину. Кожне вимірювання повторювали тричі. Обробка експериментальних даних включала розрахунок стаціонарних швидкостей та кінетичних параметрів інгібування та проводилася згідно зі стандартними методиками, оцінку кінетики досліджуваного процесу проводили в програмі для аналізу та візуалізації даних SigmaPlot 14.0.

*Статистичний аналіз.* Результати були виражені як середнє ± стандартне відхилення, оцінене у трьох незалежних повторях. Дані були проаналізовані на статистичну значущість за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу з пост-факторним тестом Tukey HSD. Достовірними вважали значення  $p < 0,05$ .

**Результати й обговорення.** В системі інгібуючу дію спостерігали в діапазоні концентрацій діосміну від 25 до 100 мкМ (рис. 1). Цей ефект був більшим, коли концентрація АФІ збільшувалася до 100 мкМ.

За результатами проведених досліджень розраховано середні значення стаціонарної швидкості реакції окиснення за каталітичної дії 15-sLOX при відповідній концентрації лінолевої кислоти.

Для оцінки кінетичного механізму інгібування 15-sLOX використовували рівняння Міхаеліса – Ментен [7]. Для визначення найбільш прийнятної кінетичної моделі та відповідного типу інгібування проведено серію розрахунків у різних умовах із ранжуванням результатів за критерієм значення коефіцієнта кореляції  $R^2$ . Розрахунок кінетичних параметрів проводили відповідно до стандартних методик та кінетичних моделей. При дослідженні діосміну найпридатнішою за критерієм значення коефіцієнта кореляції ( $R^2=0,97106$ ) є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування [8].

Обраховані за обраною моделлю кінетичні константи для діосміну мають такі значення:  $K_i = 66,14 \pm$

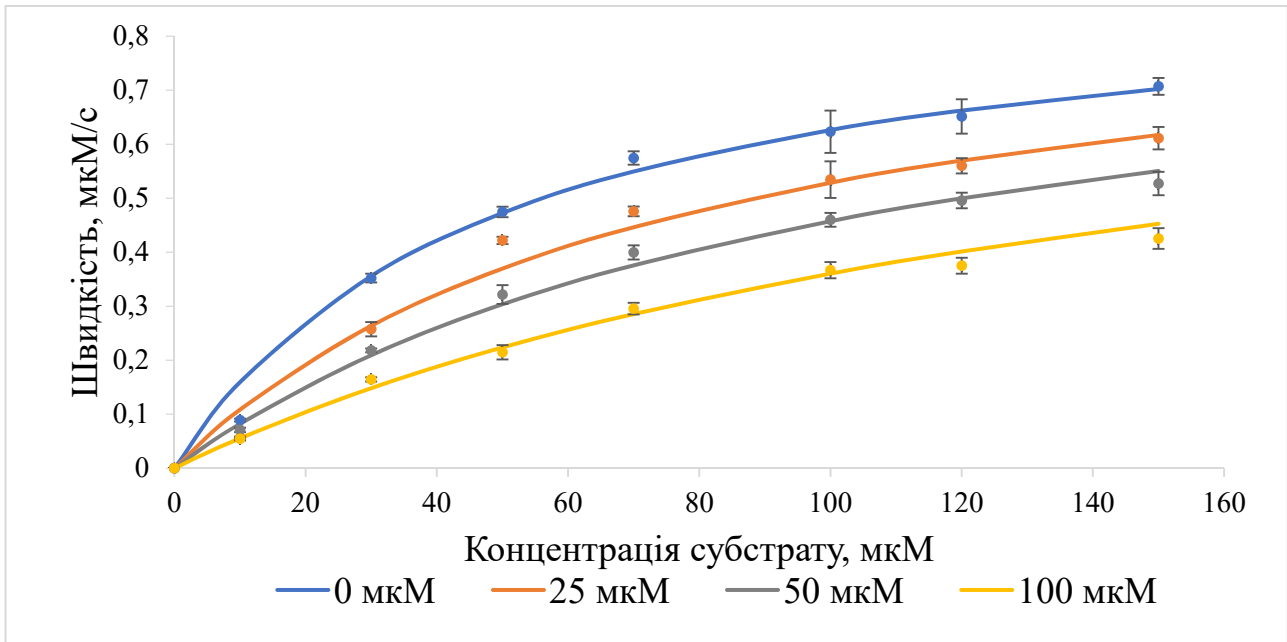


Рис. 1. Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою залежно від концентрацій субстрату та в присутності діосміну в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ.

18,34 мкМ;  $K_m = 55,54 \pm 5,86$  мкМ;  $V_{max} = 0,98 \pm 0,04$  мкМ/сек.

Діосмін як інгібітор 15-sLOX підвищує константу Міхаеліса та знижує максимальну швидкість ферментативної реакції. Наявність цих ефектів показу-

на на графіку зміни швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою залежно від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора в зворотних координатах рівняння Лайнуївера – Берка (рис. 2).

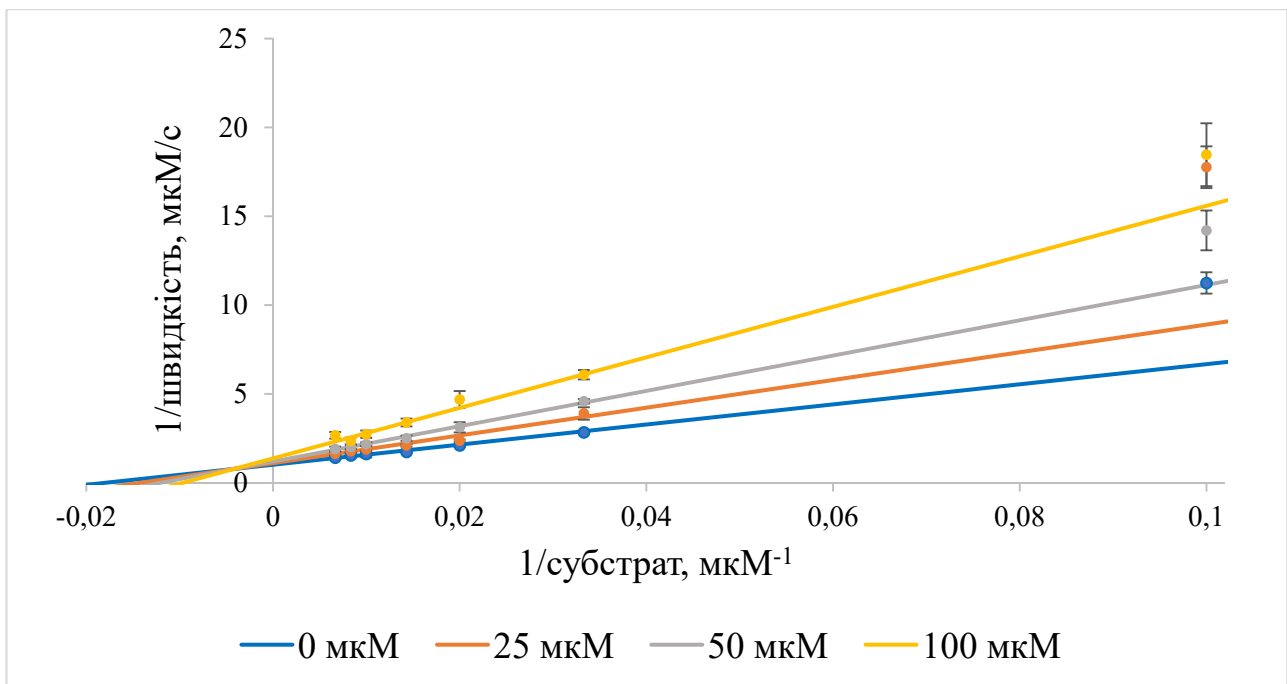


Рис. 2. Лінеаризація в координатах Лайнуївера – Берка залежно від швидкості реакції ліпоксигеназного каталізу від концентрації лінолевої кислоти та діосміну в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ.

Ці результати повністю узгоджуються з ефектом змішаного (часткового) інгібування [7]. Змішане (часткове) інгібування зустрічається в тому випадку, коли інгібітор зв'язується як у активному центрі ензиму, так і зовні, а ензим-субстратний комплекс зберігає часткову активність порівняно з нативним ензимом. Повна характеристика інгібітора включає визначення його константи інгібування ( $K_i$ ) та  $IC_{50}$ . Останнє значення розраховується як концентрація конкурентного інгібітора, необхідна для інгібування 50 % ензиму при певній концентрації субстрату. Афіність зв'язування на основі  $K_i$  діосміну розраховували за допомогою рівняння Ченга – Прусоффа [9]. Для діосміну концентрація, необхідна для досягнення 50 % інгібування 15-sLOX, становила  $IC_{50}=244,75\pm 19,91$  мкМ. Проведені дослідження дають підставу стверджувати, що діосмін є інгібітором 15-ліпоксигенази середньої активності за змішаним (частковим) механізмом інгібування.

Результати експерименту свідчать, що діосмін як інгібітор 15-ліпоксигенази можна розглядати як перспективний компонент комбінованих протизапальних лікарських засобів. Розробка та досліджен-

ня фармацевтичних композицій на основі діосміну як м'якого інгібітора 15-ліпоксигенази є потенційними завданнями майбутніх наукових розвідок у справі створення комплексних геріатричних препаратів.

**Висновки.** Проведені дослідження характеризують діосмін як дозозалежний інгібітор 15-ліпоксигенази середньої активності з  $IC_{50}=244,75\pm 19,91$  мкМ зі змішаним (частковим) механізмом інгібування. Вивчення інгібування 15-sLOX діосміном та речовинами подібної хімічної структури може стати ефективним способом оцінки протизапальних властивостей речовин на етапі доклінічних досліджень. Одержані результати можуть бути використані при плануванні фармакологічних досліджень флавоноїдів та на первинних етапах фармацевтичної розробки нових лікарських засобів протизапальної дії.

**Конфлікт інтересів.** Конфлікт інтересів відсутній.  
**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

**Дані про фінансову підтримку:** виконано за фінансової підтримки Міністерства освіти та науки України (грант 0122U000139).

## MECHANISM OF 15-LIPOXYGENASE INHIBITION BY DIOSMIN

V. I. Bessarabov, N. P. Zderko

*Kyiv National University of Technologies and Design*  
*v.bessarabov@kyivpharma.eu*

**The aim of the work.** Study of the anti-inflammatory properties of diosmin using the method of evaluating the mechanism of inhibition of 15-lipoxygenase from soybeans (15-sLOX).

**Materials and Methods.** The study of inhibition of 15-sLOX by diosmin was performed by recording the formation of the conjugate at 234 nm using the spectrophotometric method. Linoleic acid was used as a substrate. The processing of experimental data included the calculation of steady-state velocities and kinetic parameters of inhibition and was carried out according to standard methods, the kinetics of the studied process were evaluated in the SigmaPlot 14.0 data analysis and visualization program.

**Results and Discussion.** It was established that diosmin inhibits 15-lipoxygenase with  $IC_{50}=244.75\pm 19.91$   $\mu$ M. When studying the mechanism of inhibition by diosmin 15-sLOX, it was found that the most suitable according to the criterion of the value of the correlation coefficient ( $R^2=0.97106$ ) is the Mixed (Partial) model, that is, a mixed (partial) type of inhibition. The kinetic constants for diosmin calculated according to the selected model have the following values:  $K_i=66.14\pm 18.34$   $\mu$ M;  $K_m=55.54\pm 5.86$   $\mu$ M;  $V_{max}=0.98\pm 0.04$   $\mu$ M/sec.

**Conclusions.** It has been established that diosmin is a dose-dependent inhibitor of 15-lipoxygenase. The obtained results make it possible to consider the study of in vitro inhibition of 15-sLOX by diosmin and substances of a similar chemical structure as an effective way of studying the anti-inflammatory properties of substances at the stage of preclinical studies. The obtained data on the mechanism of inhibition can be used in the planning of pharmacological studies of flavonoids and in the initial stages of pharmaceutical development of new anti-inflammatory drugs.

**Key words:** diosmin; flavonoids; 15-lipoxygenase; inflammation; active pharmaceutical ingredient; molecular mechanism.

### Перелік бібліографічних посилань

1. Experimental comparative study of the efficacy and side effects of *Cissus quadrangularis* L. (Vitaceae) to Daflon (Servier) and placebo in the treatment of acute hemorrhoids. S. Panpimanmas, S. Sithipongsri, C. Sukdanon, C. Manmee. *J. Med. Assoc. Thai.* 2010. Vol. 93 (12). P. 1360–1367.
2. The effect of a flavonoid fractions diosmin + hesperidin on radiation-induced acute proctitis in a rat model. A. Sezer,

- U. Usta, Z. Kocak, M. A. Yagci. *J. Cancer Res. Ther.* 2011. Vol. 7 (12). P. 152–156. DOI: 10.4103/0973-1482.82927.
- Carballo-Villalobos, A.I., Gonzalez-Trujano, M.-E., Pellicer, F., Lopez-Munoz. Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *Biomed. Res. Int.* 2016. 2016. P. 8263463. DOI: 10.1155/2016/8263463.
  - Effect of diosmin administration in patients with chronic venous disorders on selected factors affecting angiogenesis. *Molecules.* 2019. Vol. 12; 24(18). pii: molecules24183316. DOI: 10.3390/molecules24183316.
  - Influence of diosmin treatment on the level of oxidative stress markers in patients with chronic venous insufficiency. M. Feldo, M. Wozniak, M. Wojciak-Kosior et al. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018. Vol. 28. P. 2561705. DOI: 10.1155/2018/2561705.
  - Inhibition of soybean 15-lipoxygenase and human 5-lipoxygenase by extracts of leaves, stem bark, phenols and catechols isolated from lithraea caustica (anacardiaceae). A. Munoz-Ramírez, C. Mascayano-Collado, A. Barriga et al. *Front. Pharmacol.* 2020. Vol. 11. P. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594257>.
  - Dowd J. E., Riggs D. S. A comparison of estimates of michaelis-menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chem.* 1965. Vol. 240. P. 863–869. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)45254-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)45254-9).
  - Buker S. M., Boriack-Sjodin P. A., Copeland R. A. Enzyme–inhibitor interactions and a simple, rapid method for determining inhibition modality. *SLAS Discov.* 2019. Vol. 24. P. 515–522. <https://doi.org/10.1177/2472555219829898>.
  - Yung-Chi C., Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973. Vol. 22. P. 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).

## References

- Panpimanmas, S, Sithipongsri, S, Sukdanon, C, Manmee, C. Experimental comparative study of the efficacy and side effects of *Cissus quadrangularis* L. (Vitaceae) to Daflon (Servier) and placebo in the treatment of acute hemorrhoids. *J Med Assoc Thai.* 2010;93(12): 1360-7.
- Sezer, A, Usta, U, Kocak, Z, Yagci, MA. The effect of a flavonoid fractions diosmin + hesperidin on radiation-induced acute proctitis in a rat model. *J Cancer Res. Ther.* 2011;7(12): 152-6. DOI: 10.4103/0973-1482.82927.
- Carballo-Villalobos, AI, Gonzalez-Trujano, M-E, Pellicer, F, Lopez-Munoz, FJ. Antihyperalgesic effect of hesperidin improves with diosmin in experimental neuropathic pain. *Biomed Res Int.* 2016;2016: 8263463. DOI: 10.1155/2016/8263463.
- Feldo M, Wojciak-Kosior M, Sowa I, Kocki J, Bogucki J, Zubilewicz T, Kesik J, Bogucka-Kocka A. Effect of diosmin administration in patients with chronic venous disorders on selected factors affecting angiogenesis. *Molecules.* 2019;12:24(18). pii: molecules24183316. DOI: 10.3390/molecules24183316.
- Feldo M, Wozniak M, Wojciak-Kosior M, Sowa I, KotWasik A, Aszyk J, Bogucki J, Zubilewicz T, Bogucka-Kocka A. Influence of diosmin treatment on the level of oxidative stress markers in patients with chronic venous insufficiency. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;28:2018: 2561705. DOI: 10.1155/2018/2561705.
- Munoz-Ramírez A, Mascayano-Collado C, Barriga A, Echeverría J, Urzúa A. Inhibition of soybean 15-lipoxygenase and human 5-lipoxygenase by extracts of leaves, stem bark, phenols and catechols isolated from lithraea caustica (anacardiaceae). *Front Pharmacol.* 2020;11: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594257>.
- Dowd JE, Riggs DS. A comparison of estimates of michaelis-menten kinetic constants from various linear transformations. *J Biol Chem.* 1965;240: 863-9. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)45254-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)45254-9).
- Buker SM, Boriack-Sjodin PA, Copeland RA. Enzyme–inhibitor interactions and a simple, rapid method for determining inhibition modality. *SLAS Discov.* 2019;24: 515-22. <https://doi.org/10.1177/2472555219829898>.
- Yung-Chi C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973;22: 3099-3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).

## Відомості про авторів

**Бессарабов В. І.** – д. техн. наук, професор, професор кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu, ORCID: 0000-0003-0637-1729.

**Здерко Н. П.** – аспірант кафедри промислової фармації, Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна. E-mail: nzderko@gmail.com, ORCID: 0000-0002-0549-7672.

## Information about the authors

**Bessarabov V. I.** – Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine. E-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu, ORCID: 0000-0003-0637-1729.

**Zderko N. P.** – Postgraduate of the Department of Industrial Pharmacy, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine. E-mail: nzderko@gmail.com, ORCID: 0000-0002-0549-7672.