

Ivan Kocić

Katedra i Zakład Farmakologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Diosmina — skuteczność kliniczna i bezpieczeństwo stosowania

Diosmin — clinical efficacy and safety

STRESZCZENIE

Terapia stanów zapalnych dotyczących naczyń żylnych jest skomplikowana i wymaga dużo cierpliwości oraz dobrej współpracy lekarza i pacjenta. W tym kontekście istotną rolę odgrywa farmakoterapia, chociaż w świetle medycyny opartej na faktach (EBM, *evidence based medicine*) dowody w przypadku niektórych substancji nie są najwyższej jakości. Diosmina jest jednym z najczęściej stosowanych leków w stanach zapalnych naczyń żylnych. Obecnie na rynku farmaceutycznym występuje w postaci preparatu pochodzenia naturalnego (starszej generacji, mniej oczyszczony), w formie zmikronizowanej w połączeniu z hesperydyną oraz jako substancja półsyntetyczna bez hesperydyny. Dotychczas opublikowane dane kliniczne potwierdzają skuteczność kliniczną dwóch pierwszych form preparatu w leczeniu stanów zapalnych żył, jednak większość tych badań ma niewielką wartość naukową (< 2 pkt w skali Jadada), a w przypadku preparatu półsyntetycznego opublikowano wyniki tylko jednego badania randomizowanego.

W niniejszym artykule omówiono najważniejsze dane kliniczne dotyczące skuteczności klinicznej i profilu bezpieczeństwa wymienionych substancji.

Forum Medycyny Rodzinnej 2014, tom 8, nr 2, 56–63

Słowa kluczowe: zapalenie żył, diosmina, hesperydyna, EBM, skuteczność kliniczna

ABSTRACT

The treatment of chronic venous insufficiency (CVI) is complicated and requires consistency and good collaboration between patients and doctors. In this context, pharmacotherapy of CVI deserves special attention, however, some of drugs used for this purpose have not hard enough evidences for clinical efficacy according to evidence based medicine (EBM). Diosmin is one of the most frequently used substances for the treatment of CVI. Actually, diosmin as a drug on the market exists in form of natural product (old generation, without high purity), in micronized form together with hesperidin and as semi-synthetic substance without hesperidin. Up to date published data support clinical efficacy of the first and second forms of diosmin in treatment of CVI mentioned above, however the value of the majority of published clinical trials is low (less than 2 points according to Jadad scale), while in case of semi-synthetic form there is only one published randomized clinical trial.

Adres do korespondencji:
prof. dr hab. n. med. Ivan Kocić
Katedra i Zakład Farmakologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny

In the present paper, the most important clinical data related to clinical efficacy and safety of diosmin are discussed.

Forum Medycyny Rodzinnej 2014, vol 8, no 2, 56–63

key words: diosmin, chronic venous insufficiency, hesperidin, evidence based medicine, clinical efficacy

WSTĘP

Podstawowym wskazaniem do zastosowania diosminy jest zapalenie żył, którego pierwszym zauważalnym objawem są żylaki. Do zapalenia żył dochodzi najczęściej w obrębie kończyn dolnych [1]. W kończynach dolnych istnieją 2 systemy żylny cyrkulacji — powierzchowny i głęboki, co jest istotne klinicznie, ponieważ w przypadku choroby jednego systemu drugi może przejąć jego funkcję (ryc. 1). Owrzodzenia żyłne kończyn dolnych to bardzo ważny problem zdrowotny, dotyczący od 0,1% populacji ogólnej do aż 2% populacji osób powyżej 80. roku życia [2]. Co więcej, koszt, który ponosi system opieki zdrowotnej z tytułu leczenia, oszacowano w Wielkiej Brytanii na ponad 400 milionów funtów, a we Francji i Niemczech to około 2% całkowitych nakładów finansowych na służbę zdrowia [3–5]. Predyspozycja genetyczna jest bardzo ważna w ocenie ryzyka wystąpienia przewlekłego zapalenia żył głębokich, ale decydującą rolę odgrywa narażenie na jeden z następujących



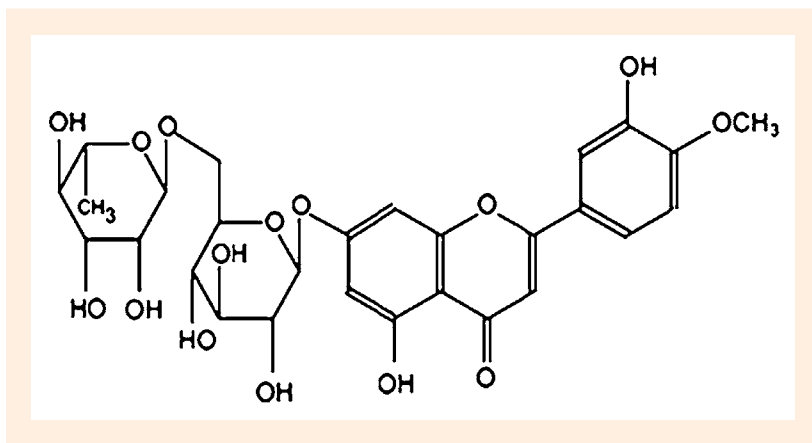
Rycina 1. Układ żylny w obrębie kończyny dolnej

czynników ryzyka: choroby zakaźne i bakteryjne, urazy mechaniczne, wielogodzinna praca w pozycji stojącej, płaskostopie, przebyte ciąży i otyłość. Zależność między masą ciała a chorobami układu żylnego jest dobrze znana, dodatkowo osoby otyłe mało się ruszają, co również wpływa niekorzystnie na stan ich żył [1].

Profilaktyka to przede wszystkim ruch, pod warunkiem że układ żylny jest zdrowy (w stanie zapalnym nie wolno ćwiczyć, dopóki choroba nie zostanie opanowana). Najważniejsze są ćwiczenia usprawniające grupy mięśni nóg, jak gimnastyka, jazda na rowerze, pływanie. Osoby ze skłonnością do żylaków lub wykonujące wielogodzinną pracę w pozycji stojącej czy siedzącej powinny nosić specjalne rajstopy lub pończochy elastyczne, które chronią przed powstawaniem zakrzepów żylnych. Korzystny wpływ na żyły mają masaż, a także spanie na materacu, którego dolna część jest uniesiona. Warto przy każdej okazji przyjmować pozycję horyzontalną, z lekko uniesionymi nogami [1].

Chirurgiczne usunięcie żylaków, które może rozwiązać problem zarówno z punktu widzenia zdrowotnego, jak i estetycznego, jest możliwe tylko u osób ze zdrowym układem żył głębokich. Takich operacji wykonuje się w Polsce około 25 000 rocznie. Należy jednak pamiętać, że naczynia żyłne powierzchniowe to naturalny materiał rekonstrukcyjny układu tętniczego, bezcenny przy operacjach typu pomostowego na naczyniach wieńcowych oraz naczyniach w mózgu, nerkach czy wątrobie [6–8].

W terapii farmakologicznej, oprócz leków przeciwzakrzepowych i przeciwplatekcyjnych, najczęściej są stosowane leki przeciwzapalne



Rycina 2. Struktura diosminy (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone-7-ramnoglucoside)

i chroniące naczynia żylne (*venoprotection*), do których należy diosmina, z unikalną strukturą i mechanizmem działania [9–11].

Jednoznaczne stwierdzenie skuteczności klinicznej danego leku lub technologii medycznej nie jest proste [12]. Według przeważających i obiektywnych informacji dotyczących tego zagadnienia zgodnie z zasadami medycyny opartej na faktach (EBM, *evidence based medicine*) uważa się, że dana technologia medyczna ma udowodnioną skuteczność kliniczną, jeżeli w badaniach klinicznych typu RCT (*randomized clinical trial*), przeprowadzonych zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej i spełniających podstawowe kryteria Jadada, wykazano jej korzystny wpływ i potwierdzono go w warunkach rzeczywistych (zazwyczaj po kilku latach stosowania) [13]. Obecnie w praktyce klinicznej w Polsce jest ciągle dużo substancji oraz procedur medycznych i diagnostycznych często stosowanych, ale bez potwierdzonej skuteczności klinicznej zgodnie z wyżej wymienionymi kryteriami. W przypadku nowych i obiecujących technologii może to być częściowo uzasadnione. Bardzo niebezpieczną tendencją obserwowaną w ostatnich latach, szczególnie w niektórych dziedzinach klinicznych, jest próba wprowadzania „miękkich” i mało ważnych punktów końcowych w ocenie skuteczności klinicznej (np. wiele nowych leków zostało zarejestrowanych na podstawie efektu wydłużenia czasu

do progresji choroby bez żadnego wpływu na przeżywalność chorych).

Diosmina w tym kontekście plasuje się pośrodku. Jest bardzo dużo badań potwierdzających jej skuteczność przeciwzapalną i protekcyjną w stosunku do układu żylnego, jednak jakość tych badań nie zawsze jest wysoka, a kryteria oceny skuteczności są zazwyczaj opisowe (zmniejszenie obrzęku, zaczerwienienia itd.). Diosmina występuje na rynku farmaceutycznym w postaci podstawowej, niezmienionej i w postaci zmikronizowanej (MPFF, *micronized purified flavonoid fraction*) zmieszanej z hesperydyną oraz ostatnio jako preparat półsyntetyczny, samodzielnie, bez dodatku innych flawonoidów.

DIOSMINA POCHODZENIA NATURALNEGO

Diosmina to glikozyd z grupy flawonoidów występujący w naturze, który może być izolowany z różnych roślin (ryc. 2). Substancja ta po raz pierwszy została wyizolowana w 1925 roku z liści trędownika bulwiastego (*Scrophularia nodosa*), a w 1969 roku po raz pierwszy zastosowano ją w medycynie [14].

Sok cytrynowy to zapewne najbogatsze naturalne źródło flawonoidów, związków polifenolowych pochodzenia roślinnego wzbudzających ostatnio duże zainteresowanie z powodu ich działania przeciwzapalnego i antyoksydacyjnego. Diosmina jako jeden z flawonoidów również posiada wielokierunkowe działania biologiczne, spośród których warto wspomnieć o hipoglikemicznym, przeciwzapalnym, antyoksydacyjnym, hipotensyjnym, a nawet antymutacyjnym (tab. 1) [15–17]. Jednak z punktu widzenia klinicznego jej kompleksowe działanie najczęściej było wykorzystywane w leczeniu stanów zapalnych naczyń żylnych, zazwyczaj podudzia, rzadziej odbytu [18, 19].

FARMAKOKINETYKA I FARMAKODYNAMIKA PREPARATU

W doświadczeniu przeprowadzonym na szczurach typu Wistar wykazano, że po podaniu do-

ustnym ³H-diosmina bardzo dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, jej szczytowe stężenie występuje po około 1–2 godzinach, z kompletną eliminacją po 24-godzinnym okresie obserwacji, częściowo z moczem i kałem, a po podaniu dożylnym prawie całkowicie drogą nerkową [35].

Metody oznaczania diosminy radioaktywnym wodorem albo węglem okazały się nieprecyzyjne z powodu rozkładu części cukrowej preparatu w przewodzie pokarmowym. Oznaczenia powtórzone metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), monitorując kinetykę metabolitu diosminy — diosmetyny [36]. Czas półtrwania diosmetyny jest bardzo długi i wynosi 26–43 godziny. W badaniach tych stosowano dawkę 10 mg/kg mc. i obserwowano szczytowe stężenie metabolitu w osoczu po około 60 minutach. Objętość dystrybucji (Vd) tej substancji oszacowano na około 62 l. Natomiast przy aplikacji diosminy w dawce 1000 mg opisano inny profil farmakokinetyczny, ze szczytowym stężeniem diosmetyny po około 3 godzinach i czasem półtrwania tylko 1,1 godziny [37].

Jean i Bodinier wykazali jednoznacznie, że diosmina w połączeniu z hesperydyną hamuje syntezę mediatorów zapalenia (kwas arachidonowy) oraz uwalnianie wolnych rodników, co częściowo wyjaśnia przeciwzapalne i protekcyjne działanie preparatu u chorych z zapalnymi stanami naczyń żylnych [38]. Ponadto stwierdzono, że diosmina hamuje inaktywację noradrenaliny [39]. Warto dodać, że wykazano również istotne pozytywne działanie tej substancji na przepływ w naczyniach chłonnych, co ma duże znaczenie kliniczne w poprawie krążenia obwodowego [40]. Interesujące wydaje się też doniesienie o stymulującym działaniu diosminy i diosmetyny na transkrypcję genu *CYP1A1* dla tego izoenzymu w kompleksie cytochromu P450 poprzez receptor arylo-wodorowęglowy, ale bezpośrednim hamującym działaniu samej diosmetyny na aktywność samego enzymu CYP1A1, zmniejszającym ak-

Tabela 1

Najważniejsze dotychczas opisane działania biologiczne flawonoidów diosminy i hesperydyny

Działanie	Źródło
Przeciwzapalne i przeciwbólowe	Galati i wsp. 1994; Emim i wsp. 1994; Damon i wsp. 1987 [20–22]
Przeciwbakteryjne	Bae i wsp. 1999 [23]
Przeciwgrzybicze	Krolicki, Lamer-Zarawska 1984 [24]
Antykoncepcyjne	Joyce, Zaneveld 1985 [25]
Przeciwnowotworowe	Yang i wsp. 1997; Tanaka i wsp. 1997 [26, 27]
Antyalergiczne	Kubo, Matsuda 1992 [28]
Antyoksydacyjne	Jovanovic i wsp. 1994; Malterud, Rydland 2000 [29, 30]
Immunomodulujące	Kim, Cho 1991 [31]
Poprawiające gojenie się ran	Hasanoglu i wsp. 2001 [32]
Przeciwplytkowe i antyadhezyjne	Zaragoza i wsp. 1985; Friesenecker i wsp. 1994 [33, 34]

tywność niektórych nowotworów [41]. Należy także odnotować działanie neuroprotekcyjne polegające na zmniejszeniu apoptozy w komórkach PC-12 i ekspresji TNF- α [42].

**SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA PREPARATU
W LECZENIU PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA
NACZYŃ ŻYLNICH PODUDZIA**

W ocenie skuteczności klinicznej diosminy pochodzenia naturalnego w leczeniu przewlekłego zapalenia naczyń żylnych najczęściej stosowano dawkę 500 mg 2 razy na dobę oraz opisową ocenę zmian klinicznych, jak stopień gojenia się owrzodzeń, ustępowania obrzęków czy dolegliwości bólowych związanych z żyłami, a także zmian funkcjonalnych [43–45]. Dość często mierzono wartości ciśnienia tętniczego i filtracji kapilarnej [46]. W kilkunastu opisanych badaniach klinicznych, wśród których są też badania typu RCT, zazwyczaj wykazywano korzystny wpływ kompleksu diosmina + hesperydyna (proporcja 9:1) na podstawowe parametry hemodynamiczne obwodowych naczyń żylnych, chociaż są też badania, w których działanie flawonoidów nie różniło się istotnie od placebo [47]. W największym dotychczas opisanym badaniu znanym pod nazwą RELIEF (*Reflux assessment and quality of life improvement with micronized flavonoids*), obejmującym

5052 chorych w średnim wieku 45 lat, stosowano diosminę w dawce 500 mg 2 razy na dobę przez 6 miesięcy. Głównym monitorowanym objawem był obrzęk podudzia i obwód kostki [48]. Było to wieloośrodkowe badanie prospektywne, a wszystkich chorych podzielono na 2 grupy na podstawie obecności refluku **żylnego** (czyli cofania się krwi z układu głębokiego do układu żył powierzchownych). Ponadto na podstawie skali **CEAP** (**C** — objawy kliniczne od 0 do 6; **E** — etiologia choroby, **c** — wrodzona, **p** — pierwotna i **s** — wtórna, nabyta; **A** — umiejscowienie anatomiczne, **s** — powierzchniowe, **d** — głębokie, **p** — przesywające; **P** — patofizjologia, **r** — refluks, **o** — niedrożność, **r + o**) oceny stopnia zaawansowania przewlekłej niewydolności naczyń żylnych dokonano klasyfikacji chorych do grup od C₀ do C₄. U ponad 50% badanych stwierdzono ustąpienie refluku żylnego, a objawy, takie jak bóle, uczucie ciężkości nóg, obrzęki i skurcze, istotnie się zmniejszyły ($p < 0,0001$).

Badano również efekty leczenia preparatem MPFF w dawce 1000 mg/dobę i uzyskano efekty porównywalne z badaniami, w których stosowano dawkę 500 mg 2 razy na dobę [49]. Farmakokinetyczne zmiany opisywane dla dawki 1000 mg/dobę kwestionują możliwość uzyskania korzystnych efektów przy takim sposobie dawkowania leku, ponieważ już po krótkim czasie (ok. 1 godz.) stężenie aktywnego metabolitu diosmetyny spada na bardzo niski poziom [50]. Opisywane efekty kliniczne sugerują, że nawet krótkotrwałe działanie przy takim dawkowaniu (duża dawka leku rano) jest wystarczające do uzyskania korzystnych efektów przeciwzapalnych u osób z przewlekłym zapaleniem żył kończyn dolnych. Wydaje się, że właśnie rano system żylny jest najbardziej obciążony, chociaż dolegliwości odczuwane przez chorych występują w godzinach wieczornych. Jednak jest to pojedyncze badanie, którego wyniki nie wystarczają do podejmowania decyzji o strategii leczenia w kontekście bardzo dużej liczby badań z daw-

kowaniem 2 razy na dobę po 500 mg, w których wykazano korzystne efekty takiego postępowania. Warto dodać, że istnieją też doniesienia o przyspieszonym gojeniu się owrzodzeń żylnych pod wpływem diosminy i hesperydyny [51, 52], ale raczej tylko u osób stosujących równocześnie elastyczne kompresy, i hamującym działaniu na krwotok po chirurgicznym usunięciu żylaków odbytu [53].

Przeważa zatem wniosek, że dzięki kompleksowemu mechanizmowi działania (na naczynia żyłne, limfatyczne i włosowate) frakcja flawonoidów diosmina + hesperydyna ma korzystny wpływ u chorych z przewlekłą niewydolnością naczyń żylnych, niezależnie od stadium zaawansowania choroby. Z kolei profil bezpieczeństwa preparatu jest oceniany bardzo wysoko, działania niepożądane występują rzadko i są mało istotne. Należy jednak pamiętać o słabym działaniu przeciwplatekowym, które w połączeniu z wydłużeniem działania noradrenaliny w naczyniach żylnych może doprowadzić do krwotoku w mózgu, szczególnie u osób starszych [54, 55].

DIOSMINA PÓLSYNTETYCZNA

Brak glikozydu flawinowego hesperydyny to podstawowa różnica tej postaci farmaceutycznej i naturalnie występujących albo oczyszczonych preparatów zawierających diosminę i hesperydynę razem, zazwyczaj w proporcji 9:1. Wydaje się, że właśnie z tego powodu można by się spodziewać pewnych różnic w działaniu tych leków. Hesperydyna, podobnie do samej diosminy, od której niewiele się różni chemicznie (dodatkowe podwójne wiązanie pomiędzy dwoma cząsteczkami węgla w środkowym pierścieniu (ryc. 2), posiada szereg interesujących i korzystnych działań biologicznych [56] i tylko czasami może powodować działania niepożądane, jak nudności.

FARMAKOKINETYKA

Dotychczas nie opublikowano żadnych wyników badań dotyczących farmakokinetyki

półsyntetycznej, oczyszczonej diosminy bez zawartości hesperydyny. Można przypuszczać, że jej biodostępność i kinetyka zmian stężeń w osoczu głównego metabolitu diosminy niewiele się różnią od preparatów MPFF.

SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA

Skuteczność kliniczna diosminy półsyntetycznej była sprawdzana w kilku prospektywnych badaniach, przy pomiarach obrzęku kostki oraz porównaniu objawów klinicznych. W przypadku niewydolności naczyń żylnych kończyn dolnych stosowano dawkę 600 mg raz na dobę, natomiast w przypadku hemoroidów stosowano dawkę 2–3-krotnie większą. W 2 opublikowanych badaniach wykazano istotny korzystny wpływ preparatu diosminy w porównaniu z placebo oraz w porównaniu z MPFF z dodatkiem hesperydyny [57, 58].

PORÓWNIANIE DIOSMINY NATURALNEJ I PÓLSYNTETYCZNEJ

W badaniu typu RCT typu „*face to face*” na 126 chorych z potwierdzoną niewydolnością naczyń żylnych stwierdzono porównywalne: skuteczność kliniczną, czas wystąpienia efektów i tolerancję preparatu półsyntetycznego (dawka 600 mg/d.) oraz naturalnego (500 mg, w tym 450 mg diosminy i 50 mg hesperydyny, 2 razy/d.) [59]. Mierzono obwód goleni na poziomie 10 i 30 cm powyżej kostki oraz stosowano wizualną skalę analogową do subiektywnej oceny dolegliwości bólowych przez chorych.

PODSUMOWANIE

Dotychczas tylko w jednym badaniu stwierdzono, że preparat półsyntetyczny diosminy w dawce 600 mg raz na dobę cechuje się porównywalną skutecznością i jest równie bezpieczny jak zmikronizowany preparat pochodzenia naturalnego w połączeniu z hesperydyną stosowany w dawce 500 mg 2 razy na dobę w leczeniu przewlekłej niewydolności naczyń żylnych kończyn dolnych. Można przypuszczać, że półsyntetyczna, czysta diosmina stosowana raz na dobę w dawce 600 mg ma porównywalną skuteczność kliniczną i profil bezpieczeństwa jak MPFF w dawce 1000 mg raz na dobę, jednak takich badań jeszcze nie przeprowadzono. Skuteczność kliniczna tych leków polega na zmniejszaniu obrzęków i łagodzeniu objawów przewlekłej choroby żylniej. Leki są dobrze tolerowane, jednak należy unikać ich stosowania u chorych ze zwiększonym ryzykiem krwotoków, na przykład po krwotocznym udarze mózgu albo bezpośrednio po zabiegach chirurgicznych, oraz u osób starszych stosujących leki przeciwzakrzepowe. Jednak zgodnie z zasadami EBM i na podstawie obiektywnej oceny ekspertów zajmujących się analizą skuteczności klinicznej flawonoidy, w tym diosmina, nie mają udowodnionej skuteczności klinicznej ani w przypadku owrzodzeń żylnych, ani w samej niewydolności naczyń żylnych [60, 61]. Głównymi powodami takiej oceny są: brak standardowych kryteriów diagnostycznych przewlekłej niewydolności żylniej w większości opublikowanych badań, różnorodne kryteria włączania chorych do badań, bardzo duża rozbieżność w metodach pomiarów efektów, a otrzymane statystycznie istotne różnice w efektach są mało istotne klinicznie.

PIŚMIENNICTWO

1. Beckman J.A. Diseases of the veins. *Circulation* 2002; 106: 2170–2172.
2. Simka M., Majewski E. The social and economic burden of venous leg ulcers: focus on the role of micronized purified flavonoid fraction adjuvant therapy. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003; 4: 573–578.
3. Howlader M., Coleridge S. Chronic venous disease and venous ulcer: pharmacological approach. *J. Cardiovasc. Dis.* 2004; 2: 33–41.
4. Konstantinos K. Micronized purified flavonoid fraction (MPFF): a review of its pharmacological effects, therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2005; 3: 1–9.
5. Trent J.T., Falabella A., Eaglstein W.H., Kirsner R.S. Venous ulcers: pathophysiology and treatment options. *Ostomy Wound Management* 2005; 51: 38–54.
6. Onida S., Lane T.R., Davies A.H. Phlebectomies: to delay or not to delay? *Phlebology* 2012; 27: 103–104.
7. Górski G., Kielar M., Porzycki P., Sobański P., Noszczyk W. Effectiveness of treatment of varicose veins assessed by epidemiological comparative studies. *Pol. Merkur. Lekarski* 2004; 17: 21–24.
8. Milik K., Gembal P., Kęsik J., Zubilewicz T. Leczenie operacyjne chorób żylnych i urazów kończyn dolnych na przestrzeni dziejów. *Chirurgia Polska* 2004; 8: 269–274.
9. Araujo T., Valencia I., Federman D.G., Kirsner R.S. Managing the patients with venous ulcers. *Ann. Int. Med.* 2003; 138: 326–334.
10. Pascarella L., Schonbein G.W.S., Bergan J.J. Microcirculation and venous ulcers: a review. *Ann. Vasc. Surg.* 2005; 19: 921–927.
11. Nelson E.A., Cullum N., Jones J. Venous leg ulcers. *Clinical Evidence* 2006; 15: 1–3.
12. Juni P., Altman D.G., Egger M. Assessing the quality of controlled clinical trials. *BMJ* 2001; 323: 42–46.
13. Clark H.D., Wells G.A., Huet C. i wsp. Assessing the quality of randomized trials: reliability of the Jadad scale. *Control. Clin. Trials* 1999; 20: 448–452.
14. Monograph. Diosmin. *Altern. Med. Rev.* 2004; 9: 308–311.
15. Manthey J.A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 2000; 7: S29–S34.
16. Manuel Y., Keenoy B., Vertommen J., De Leeuw I. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr. Metab.* 1999; 12: 256–263.
17. Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* 1999; 38: 133–142.
18. Meyer O.C. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. *Angiology* 1994; 45: 579–584.
19. Cospite M. Double-blind, placebo-controlled evaluation of clinical activity and safety of Daflon 500 mg in the treatment of acute hemorrhoids. *Angiology* 1994; 45: 566–573.
20. Galati E.M., Monforte M.T., Kirjavainen S., Forstieri A.M., Tripodo M.M. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. Part 1. Antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 1994; 49: 709–712.
21. Emim J.A.D.S., Oliveira A.B., Lapa A.J. Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46: 118–122.
22. Damon M., Flandre O., Michel F., Labrid C., Crastes de Paulet A. Effects of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 alpha and thromboxane B2 release and histological changes. *Arzneimittelforsch.* 1987; 37: 1149–1153.
23. Bae E.A., Han M.J., Kim D.H. *In vitro* anti-Helicobacter activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med.* 1999; 65: 442–443.
24. Krolicki Z., Lamer-Zarawska E. Investigation of antifungal effects of flavonoids. Part 1. *Herb. Pol.* 1984; 30: 53–57.
25. Joyce C.L., Zaneveld L.J.D. Vaginal contraceptive activity of hyaluronidase and cyclooxygenase inhibitors in the rabbit. *Fertil. Steril.* 1985; 44: 426–428.
26. Yang M., Tanaka T., Hirose Y., Deguchi T., Mori H., Kawada Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Can.* 1997; 73: 719–724.
27. Tanaka T., Makita H., Ohnishi M. i wsp. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res.* 1997; 57: 246–252.
28. Kubo M., Matsuda H. Antiallergic agents containing hesperidin. *Patent Japan Kokai Tokyo Koho* 64295 1992; 428.
29. Jovanović S.V., Steenken S., Tosić M., Marjanović B., Simić M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; 116: 4846–4851.
30. Malterud K.E., Rydland K.M. Inhibition of 15-lipoxygenase from orange peel. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 5576–5580.
31. Kim C.J., Cho S.K. Pharmacological activities of flavonoids. (II)-structure activity relationships of flavonoids in immunosuppression. *Arch. Pharmacol. Res.* 1991; 14: 147–159.
32. Hasanoglu A., Ara C., Ozen S., Kali K., Ertas E. Efficacy of micronized flavonoid fraction. In healing of clean and infected wounds. *Int. J. Angiol.* 2001; 10: 41–44.
33. Zaragoza F., Iglesias I., Benedi J., Folez Corbeira P. Effects of the citroflavonoids on platelet aggregation. *Fitoterapia* 1985; 56: 343–347.
34. Friesenecker B., Tsai A.G., Allegra C., Intaglietta M. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: *in vivo* observations in the hamster skin fold. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1994; 14: 50–55.
35. Oustrin J., Fauran M.J., Commanay L. A pharmacokinetic study of 3H-diosmin. *Arzneimittelforsch.* 1977; 27: 1688–1691.

36. Cova D., De Angelis L., Giavarini F., Palladini G., Perego R. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1992; 30: 29–33.
37. Spanakis M., Kamas S., Niopas I. Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperetin in human plasma and urine by a validated GC/MS method: *in vivo* metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23: 124–131.
38. Jean T., Bodinier M.C. Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their release. *Angiology* 1994; 45: 554–559.
39. Heusser J., Osswald W. Toxicological properties of diosmin and its actions on the isolated venous tissue of the dog. *Arch. De Farmacol. Y. Toxicol.* 1977; 3: 33–40.
40. Labrid C. A lymphatic function of Daflon 500 mg. *Int. J. Angiol.* 1995; 14: 36–38.
41. Ciolino H.P., Wang T.T.Y., Yeh G.C. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* 1998; 58: 2754–2760.
42. Dholakiya S.L., Benzeroual K.E. Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- α expression. *Toxicology in vitro* 2011; 25: 1039–1044.
43. Guillot B., Guilhou J.J., de Champvallins M., Maillet C., Moccatti D., Pointel J.P. A long term treatment with a venotropic drug. *Int. Angiol.* 1989; 8: 67–71.
44. Struckmann J.R., Nicolaidis A.N. A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of Daflon 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders. *Angiology* 1994; 45: 419–428.
45. Geroulakos G., Nicolaidis A.N. Controlled studies of Daflon 500 mg in chronic venous insufficiency. *Angiology* 1994; 45: 549–553.
46. Tsouderos Y. Are the phlebotonic properties shown in clinical pharmacology predictive of a therapeutic benefit in chronic venous insufficiency? Our experience with Daflon 500 mg. *Int. Angiol.* 1989; 8: 53–59.
47. Danielsson G., Jungbeck C., Peterson K., Norgen L. A randomized controlled trial of micronized purified flavonoid fraction vs placebo in patients with chronic venous disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2002; 23: 73–76.
48. Jantet G. Chronic venous insufficiency: worldwide results of the RELIEF study. Reflux assessment and quality of life improvement with micronized flavonoids. *Angiology* 2002; 53: 245–256.
49. Menyhei G., Acsady G., Hetenyi A., Dubeaux D., Rado G. Chronobiology and clinical activity of Daflon 500 mg in chronic venous insufficiency. *Phlebology* 1994; 9: 53–59.
50. Spanakis M., Kamas S., Niopas I. Simultaneous determination of the flavonoid aglycones diosmetin and hesperidin in human plasma and urine by a validated GC/MS method: *in vivo* metabolic reduction of diosmetin to hesperetin. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23: 124–131.
51. Guilhou J.J., Dereure O., Marzin L. i wsp. Efficacy of Daflon 500 mg in venous leg ulcer healing: a double blind, randomized, controlled versus placebo trial in 107 patients. *Angiology* 1997; 48: 77–85.
52. Smith P.C. Daflon 500 mg and venous leg ulcer: new results from a meta-analysis. *Angiology* 2005; 56 (supl. 1): S33–S39.
53. Ho Y.H., Foo C.L., Seow-Choen F., Goh H.S. Prospective randomized controlled trial of a micronized flavonoid fraction to reduce bleeding after haemorrhoidectomy. *Br. J. Surg.* 1995; 82: 1034–1035.
54. Kumar R.M., Van Gompel J.J., Bower R., Rabinstein A.A. Spontaneous intraventricular hemorrhage associated with prolonged diosmin therapy. *Neurocrit. Care* 2011; 14: 438–440.
55. Straszkievicz W., Raciborski W., Słowiński P., Dąbek P. Zmiana jakości życia pacjentów z przewlekłą chorobą żylną po ośmiotygodniowym leczeniu preparatem Diosminex. *Chirurgia Polska* 2011; 13: 5–10.
56. Garg A., Garg S., Zaneveld L.J.D., Singla A.K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* 2001; 15: 655–669.
57. Maksimović Z.V., Maksimović M., Jadranin D., Kuzmanović I., Andonović O. Medicamentous treatment of chronic venous insufficiency Rusing semi-synthetic diosmin — a prospective study. *Acta Chir. Iugosl.* 2008; 55: 53–59.
58. Batchvarov I.V., Batselova M.G., Damyanov I.I. One-year diosmin therapy (600 mg) in patients with chronic venous insufficiency — results and analysis. *J. Biomed. Clin. Res.* 2010; 3: 51–54.
59. Maruszyński M., Staszkievicz W., Andziak P. Badanie wpływu półsyntetycznej diosminy i oczyszczonej zmikronizowanej frakcji flawonowej diosminy połączonej z hesperydyną na objawy przewlekłej niewydolności żylnych kończyn dolnych — czterotygodniowa obserwacja. *Przeegl. Flebol.* 2004; 12: 89–95.
60. Martinez Zapata M.J., Bonfill Cosp X., Moreno R.M., Vargas E., Capella D. Phlebotonics for venous insufficiency (Review). *Cochrane Database of Systemic Reviews* 2005; 3: CD003229.
61. Scallan C., Bell-Syer S.E.M. Flavonoids for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 2007. 2: CD006477.