pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 5, pp. 356~364 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.5.356

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식물유래 플라보노이드 Quercetin과 Isoquercetin의 생체 내 유전독성평가

박범수[1] · 한세희[1] · 이지연[1] · 정영신[1,2]*
[1]호서대학교 생명공학과, [2]호서대학교 기초과학연구소

Evaluation of *in vivo* Genotoxicity of Plant Flavonoids, Quercetin and Isoquercetin

Bumsoo Pak[1], Sehee Han[1], Jiyeon Lee[1], and Young-Shin Chung[1,2]*
[1]*Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Korea*
[2]*The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 31499, Korea*
(Received September 20, 2016/Revised September 26, 2016/Accepted September 30, 2016)

ABSTRACT - *In vivo* genotoxic potential of isoquercetin, a plant common flavonoid, in comparison with quercetin was investigated for the DNA breakage and the clastogenicity endpoints. Male ICR mice were administered by oral gavage for 3 days with 3 x 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC), 3 x isoquercetin (250, 500 mg/kg/day), 3 x quercetin (250, 500 mg/kg/day) and 2 x ethyl methanesulfonate (EMS, 200 mg/kg/day). Tissues were collected 48 hours after the first treatment and within 3 hours after the last treatment. The DNA damages were evaluated using Comet assay in liver and stomach, while the clastogenicities were determined using micronucleus test in bone marrow of same animals. The treatment of isoquercetin as well as quercetin did not cause the DNA damages in liver and stomach, and not induce the frequencies of micronucleus polychromatic erythrocytes in bone marrow. In conclusion, isoquercetin as well as quercetin did not cause the DNA breakages and the chromosomal damages *in vivo* system in these study conditions.

Key words : isoquercetin, quercetin, *in vivo* genotoxicity, comet assay, micronucleus test

플라보노이드(flavonoid)는 폴리페놀(polyphenol)의 일종으로 천연식물에 널리 분포되어 있으며 5000 종 이상의 플라보노이드 물질이 확인되었고, 대부분의 플라보노이드가 항산화력이 탁월하여 인체 및 동물실험에서 건강을 증진시키는 것으로 보고되고 있다[1,2]. Quercetin은 항산화력이 탁월한 플라보노이드 중 하나로 양파에 가장 많이 함유되어 있으며[3,4], 신경보호기능(neuroprotective)[5,6,7], 심장보호기능(cardioprotective)[8,9,10], 혈관보호기능(blood vessel protective)[11], 항염기능(anti-inflammatory)[12,13,14], 항알러지(anti-allergic properties)[15,16] 기능 등이 보고되었다. Quercetin은 aglycone 보다는 배당체인 isoquercetin (quercetin-3-glucoside, 또는 O-3-glucoside-quercetin)이나 rutin (quercetin-3-rutinoside, glucose-rhamnose의 2배당체) 으로 천연식물에 더 많이 분포되어 있으며[2] 배당체에 따라서 생체 이용률(bioavailability)에 차이가 관찰되어[1,17,18] 이들 생체이용률이 기능성 또는 안전성에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Quercetin, isoquercetin, rutin의 생체 이용률은 물질의 특징인 크기, 소수성, 배당체의 종류, 소장세포의 수송시스템에 따른 흡수율 및 대장의 박테리아에 영향을 받을 수 있으며, 랫드, 개, 돼지 및 인체에서 isoquercetin > quercetin > rutin의 순서로 관찰되었다[1,17,18,19,20,21]. Quercetin은 분자크기가 작고 소수성으로 소장에서 수동수송(passive diffusion)으로 흡수되며 절대적인 흡수율은 돼지에 경구투여 시 17% 정도로 낮은 흡수율을 보였다[19]. Isoquercetin이 더 높은 흡수율을 보이는 것은 수동수송 및 능동수송(active transport)의 두 가지 방법을 모두 사용하기 때문인 것으로 사료된다. 랫드 소장 내의 효소(lactase-phlorizin hydrolase, LPH; or lactase)는 isoquercetin을 quercetin aglycone으로 가수분해 시키고, quercetin aglycone은 수동수송으로 흡수 된다[20]. 또한, isoquercetin 배당체 그대로 Na^+-의존성 포도당 transporter인 SGLT1 수송체를 통하여 흡수되는 것이 랫드의 소장세포에서 관찰되어 보고되었다[18,20]. Isoquercetin

*Correspondence to: Young-Shin Chung, Department of Biotechnology, Hoseo University 20, Hoseo-ro 79beon-gil, Baebang-eup, Asan, Chungcheongnam-do 31499, Republic of Korea
Tel: 82-41-540-9671, Fax: 82-41-540-9538
E-mail: yschung@hoseo.edu

을 경구로 투여 하였을 때, 혈액에서 quercetin 뿐 아니라 isoquercetin을 LC-MS/MS를 사용하여 상당량 검출하였고[21], 다양한 플라보노이드를 함유한 식물추출물로 섭취시켰을 때에도 UPHLC-MS/MS의 정밀 분석방법으로 isoquercetin을 혈액에서 검출하였다[22]. 최근 quercetin과 isoquercetin에 생체 내 동태를 비교한 논문에서도, 8일까지 혈액 및 조직(간, 폐, 심장, 신장, 뇌)에서의 분포를 추적 연구하였을 때, 뇌를 포함한 대부분의 조직에서 isoquercetin이 quercetin 보다 생체 이용률이 높은 것으로 보고되었다[23]. 따라서 생체 이용률이 높기 때문에 건강기능 식품으로서의 높은 활용가능성이 제안이 되고 있는 반면, 간에서의 약물 대사 효소를 억제하거나 유도하는 유해영향도 보고되고 있어[1,24] 안전성이 심도 있게 고려되어야 한다.

Quercetin에 대한 안전성 시험결과는 다수 보고되었으나, isoquercetin의 안전성 보고는 제한적이다. Quercetin은 박테리아 활용 Ames test에서 양성으로 보고되었고[25,26], *in vitro* Sister chromatid exchange (SCE) 및 소핵시험에서도 양성으로 보고되었으며[27,28], *in vivo* 랫드에서는 소핵을 유발하지 않았고[29,30,31] 인체에서는 유전자돌연변이 및 발암가능성이 없는 물질로 평가되었다[32]. Isoquercetin의 안전성에 대하여는 2004년과 2010년에 랫드(Wistar rats)를 사용하여 수행한 13주 반복독성시험과 52주 반복독성시험 결과가 각각 보고 되었고, 이때 사용한 isoquercetin은 효소로 가수분해 시켜 생성한 isoquercetin으로 95% 순도에 물질이었다. 두 시험에서 isoquercetin에 NOAEL은 식이에 1% 용량으로 평가하였으며, isoquercetin으로는 542.4 mg/kg/day로 보고하였다. 일일 허용량(acceptable daily intake)로 환산하면 5.4 mg/kg/day로 산출되었다[33,34]. 유전독성시험결과로는 박테리아를 활용한 Ames test에서 양성결과(unpublished data)가 인용되었고[34], 세포주 실험에서 SCE와 MN의 양성결과가 보고되었고[28], isoquercetin을 다량 함유한 아티초크(Artichoke, *Cynara Scolymus* L.) 추출물도 최고용량인 2000 mg/kg/day으로 3회 투여 시 *in vivo* 마우스 골수 세포의 comet assay 에서 DNA 손상을 유발하는 것으로 나타났다[35].

따라서 본 연구에서는 isoquercetin이 유전자 stability에 영향을 주는 지를 평가하기 위하여 *in vivo* 마우스를 사용하였다. 위와 간세포에서 Comet assay를 수행하여 DNA 손상정도를 관찰하였고, 골수세포를 사용하여 소핵 유발가능성을 평가하였다. Isoquercetin은 quercetin의 배당체이므로 quercetin과 비교 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

실험 시료 및 재료

본 실험에 사용된 시약 중, Isoquercetin (Cas no. 482-35-9, 98%)는 International Laboratory (South San Francisco, LA, USA)에서 구입하였으며 Quercetin (Cas no. 117-369-5, 96%), Ethyl methanesulfonate (EMS), Sodium carboxymethyl cellulose (CMC), Sodium chloride, Sodium hydroxide, Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) disodium salt dehydrate, Tris aminomethane, Triton X-100, Dimethyl sulfoxide는 SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입을 하였으며 Ca & Mg Free HBSS는 WELGENE 사(Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, South Korea) 제품을 사용하였으며 SYBR Gold, Comet slide, Low-Melting Agarose은 TREVIGEN 사(Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였다.

실험동물 관리 및 투여

본 실험에 사용한 실험동물은 ICR 마우스(6주령, male, SPF)로 (주)나라바이오텍(경기도 평택)에서 구입하였고 호서대학교 안전성평가센터 GLP 연구동에서 관리하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 각각 12시간으로 맞추어 주었고, 22 ± 3ºC, 습도 55 ± 20% 로 유지하였으며, 물과 사료는 자유 급이 시켰다. 실험동물 케이지는 폴리프로필렌 재질을 사용하였고 크기는 220W × 270D × 130H로 하였으며 한 케이지 당 5마리씩 수용하였다.

입수된 실험동물을 5일 동안 순응시킨 후, 군당 5마리씩 6군으로 나누고, 다음과 같이 투여물질과 용량을 배정을 하였다. 음성대조(Vehicle군, 0.5% CMC), 양성대조(EMS, 200 mg/kg), isoquercetin (250, 500 mg/kg/day), quercetin (250, 500 mg/kg/day) 군으로 하였고 최대 10 ml/kg 투여용량으로 물질을 조제하였고 당일 조제하여 경구 투여하였으며 실험기간 동안 체중측정과 임상 증상을 관찰하였다. Isoquercetin과 quercetin의 용해도를 고려하여 부형제로 0.5% CMC을 사용하였으며 균질하게 부유시켜 균일하게 투약이 가능한 최고 농도를 사용하였다.

음성대조 및 시험물질의 투여는 3회(투여 간격은 각각 24시간과 21시간)로 하였고 양성대조군은 2회(투여간격은 21시간)로 하였으며 마지막 투여 후 3시간에 CO_2로 마취시킨 후 방혈/치사 시켰다. 간과 위는 Comet assay에 사용하였고 골수세포는 대퇴부에서 채취하여 소핵시험에 사용하였다. 본 동물실험은 호서대학교 안전성평가센터 동물실험윤리위원회에서 동물실험계획서를 검토하고 승인한 후 진행하였다(승인번호 HTRC-16-20).

Comet assay (위 및 간세포)

위와 간의 단세포 제작

위를 적출 후 전위를 제거하고 glandular stomach에서 다음과 같은 방법으로 위 점막세포를 수집하여 사용하였다. 다량의 차가운 세절 버퍼로 절제한 glandular stomach을 세척한 후 표면상피를 가볍게 긁어 버리고 차가운 세절

버퍼에 15분간 담근다. Scrapper를 이용하여 위 점막을 긁어 점막세포를 방출시켜 현탁액을 얻고 아가 젤(agar gel) 슬라이드 제작 시까지 얼음 위에 보관하였다. 또한, 간 조직을 적출하여 간의 무게를 측량한 후 좌측 엽(left lateral lobe) 일부를 절제하고 차가운 세절 버퍼로 충분히 세척한 후 가위로 잘게 세절하여 세포 현탁액을 얻었고, 얼음에서 보관한 후 아가 젤 슬라이드 제작에 사용하였다[36].

Comet 슬라이드 제작 및 전기영동

Comet assay를 위한 슬라이드 제작 및 전기영동은 Tice 등의 방법[36] 및 JaCVAM 검증연구에서 제시한 방법[37]을 사용하였고 다음에 상세히 설명하였다. 위와 간, 각각의 세포 현탁액 40 µl를 360 µl의 low melting agarose (LMA, 0.6~1.0%)와 혼합하고 혼합액 80 µl를 Comet 슬라이드(Trevigen Co.)의 well에 도말하였다. 차광된 상태로 굳힌 후 차가운 lysis solution (pH 10.0)에 1시간 이상 담가 세포막과 핵막을 용해시켰다. Comet 슬라이드를 멸균된 3차 증류수로 조심스럽게 세척하고 alkaline solution (pH > 13.0)에 20분간 담가 DNA 이중나선을 풀어준 후 전기영동장치로 옮기고 적당량의 알칼리용액을 사용하여 0.7 V/cm, 300 mA에서 30분간 전기영동을 하였다. Comet 슬라이드를 멸균된 3차 증류수에 5분간 담가 알칼리용액을 제거한 후 70% 에탄올에 5분간 담가 세포를 고정하였다. Comet 슬라이드를 차광된 곳에서 건조시킨 후 SYBR Gold 염색시약(pH 7.5)을 TE buffer에 희석하여 염색하였다.

DNA 손상평가 및 판정

단세포에서 DNA 손상정도를 평가하기 위하여 CCD 카메라로 연결된 형광현미경(Leica DMi8)을 사용하여 100배 또는 400배 배율에서 단세포를 관찰하였고 이미지 자동분석 소프트웨어(Perceptive Instruments 회사의 Comet Assay IV)로 분석하였다. 실험동물의 조직 당 두 개의 wells에서 15영역 이상을 분석하였고 well 내 편중을 피하기 위하여 한 영역 당 5개 세포이상을 분석하지 않았다. DNA 손상이 심한 경우(“hedgehogs”라고 함. 머리 부분이 없고 꼬리가 많이 퍼져있는 모양)는 분석에 사용하지 않았고 hedgehogs의 수를 세었다. 시험결과 평가를 위하여 % head DNA, % tail DNA, tail length, tail moment를 측정하여 분석하였다. 각 조직 당 150개 단세포 DNA 전기영동 이미지 분석 값의 평균과 표준편차를 구하였다. 단세포에서 DNA 손상 분석으로부터 결과판정은 JaCVAM 검증연구에서 제시된 기준으로 하였다[35]. 음성대조 DNA 손상 분석 중 % tail DNA가 위 세포에서 1-20%, 간세포에서 1~8% 범위 내로 측정되고, 양성대조에서 뚜렷한 증가를 보일 때, 시험의 적절성 및 타당성을 인정하였다. 시험물질에 대하여는 음성대조와 비교하여 통계적으로 유의한($p < 0.05$) 차이를 보이거나 용량 의존적 증가가 관찰될 때, DNA 손상에 대한 양성으로 판정하였다.

소핵시험 (골수세포)

Schmid[38]의 시험방법과 OECD guideline (TG 474)[39]에 따라 마우스 소핵시험을 수행하였고 상세하게는 다음과 같다. *In vivo* 골수에서 소핵을 분석하기 위하여 마우스 대퇴골을 적출하였고 우태아 혈청을 1 ml을 관류시켜 골수 세포 현탁액을 얻었다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물에 우태아 혈청을 넣어 현탁시킨 후 슬라이드 제작에 사용하였다. 개체 당 2개의 골수 도말 슬라이드를 제작하였고 메탄올 고정 후 5% Giemsa 용액으로 염색하였다. 현미경 관찰(1000배 배율)을 통하여 개체 당 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(Normochromatic erythrocyte, NCE)의 합이 500개가 되도록 계수하였고 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율[PCE/(PCE + NCE)]을 산출하였다. 또한, PCE 지름의 1/20~1/5 크기에 Giemsa로 염색된 작고 둥근 모양을 소핵으로 정의하였고, 개체 당 다염성적혈구가 2,000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 비율(% MNPCE = MNPCE/1000PCE)을 구하여 유전독성의 지표로 사용하였다. MNPCE의 비율이 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 상승하고 용량 의존적으로 증가하거나 적어도 1개 이상의 용량 군에서 통계적으로 재현성이 관찰될 때 유전독성 양성으로 판정하였다.

통계처리

Comet assay에서 시험물질의 DNA 손상에 대한 음성 또는 양성 판정을 위하여 Dunnett’s test (two-sided)와 Linear trend test (two-sided)를 수행하여 통계적 유의성($p < 0.05$)을 판정하였고 양성대조군에 대하여는 Student’s test (one sided)로 부터 통계적 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다. 소핵시험에서 소핵다염성적혈구 유발빈도에 대해서는 Fisher’s exact test를 실시하여 유의성($p < 0.05$)을 검정하였고 다염성적혈구의 출현빈도와 체중의 변화는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성($p < 0.05$)을 판정하였다.

Results

일반증상 관찰

시험 전 기간을 통하여 대조군을 비롯한 모든 실험동물군에서 폐사한 동물은 없었다. 또한, 특이적인 임상증상도 관찰되지 않았다.

체중 및 조직 무게

실험 기간 동안의 체중 및 간 무게를 Table 1에 제시하

Table 1. Effects of the administration of isoquercetin and quercetin on the body and liver weights

Chemical	Dose (mg/kg/day)	Body weight (g)		Liver weight on Day3 (g)	Relative liver weight (%)[2)]
		on Day1	on Day3		
0.5% CMC		31.6 ± 0.7[1)]	31.6 ± 0.9	1.75 ± 0.18	5.55 ± 0.63
EMS	200	32.1 ± 1.3	30.3 ± 1.1	1.54 ± 0.23	5.07 ± 0.68
Isoquercetin	250	33.0 ± 1.1	32.2 ± 0.8	2.06 ± 0.16	6.39 ± 0.43
Isoquercetin	500	32.2 ± 1.2	31.1 ± 1.9	1.76 ± 0.13	5.65 ± 0.24
Quercetin	250	32.4 ± 0.9	31.7 ± 1.4	1.92 ± 0.21	6.04 ± 0.42
Quercetin	500	32.2 ± 1.1	32.1 ± 1.2	1.73 ± 0.21	5.36 ± 0.47

[1)]Each value is Mean ± SD
[2)]Liver weight / body weight × 100
CMC: Carboxymethyl cellulose, EMS: Ethyl methanesulfonate.

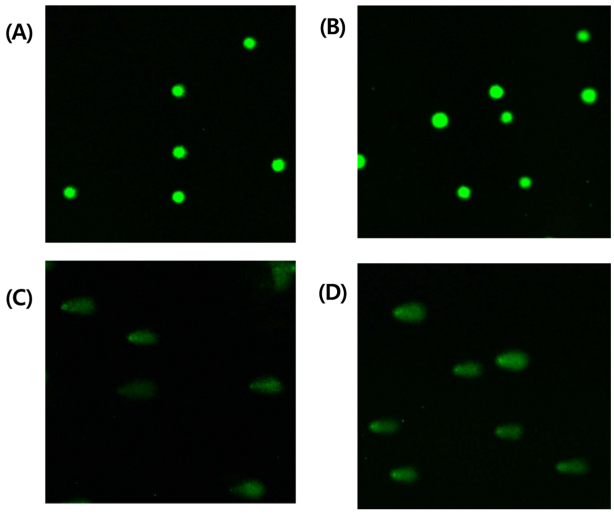

Fig. 1. The representative comet images of DNA using mice stomach and liver cells. Stomach (A) and liver (B) cells in negative control and stomach (C) and liver (D) cells in positive control.

였다. 모든 투여 군에서 투여 전과 투여 후에 통계적으로 유의한 체중의 변화는 관찰되지 않았으며 부검 시 체중과 간 무게도 투여 군 간에 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 체중에 대한 간의 상대 중량비율은 양성대조에서 감소하는 경향이 관찰되었고 isoquercetin과 quercetin의 저용량(250 mg/kg/day) 투여 군에서 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적이지 않았다($p > 0.05$).

DNA 손상 평가

Comet assay는 단세포를 agar 젤과 함께 슬라이드에 도말하고 전기영동 후 세포 내 DNA를 형광 염색하여 DNA 손상정도를 관찰하는 시험법으로 본 시험에서 제작한 Comet 슬라이드의 대표적인 형광현미경 images를 Fig. 1에 제시하였다. 음성대조군 마우스의 위와 간세포 전기영동 이미지는 원형의 DNA로 나타났고, 양성대조인 EMS 처리군은 DNA 손상에 의한 DNA tail이 관찰되었다. 형광현미경에서 관찰된 이미지의 분석을 통해 DNA 손상지표들의 값을 산출하였고 Table 2와 Table 3에 각각 제시하였다. % head DNA 값은 형광이미지 머리 부분의 DNA 분포 비율이며, % tail DNA 값은 DNA 손상에 의해 나타난 tail에 분포하는 DNA 비율이며, tail length는 head 중심에서 tail의 끝까지의 거리를 의미하며, tail moment는 % tail DNA와 tail length를 함께 반영하여 산출한 것이다.

Table 2는 각 시험군의 위 세포에서 DNA 손상 지표를 나타내며, Table 3에는 간세포의 DNA 손상 지표를 제시

Table 2. Results of the Comet assay using cells from the stomach of mice treated with isoquercetin and quercetin

Chemical	Dose (mg/kg)	Scored cells	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Tail length (um)	Tail moment[2)]
0.5% CMC		150	94.29 ± 1.70[1)]	5.71 ± 1.70	51.31 ± 2.74	1.49 ± 0.47
EMS	200	150	49.97 ± 10.42*	50.03 ± 10.42*	94.28 ± 5.35*	18.43 ± 6.27*
Isoquercetin	250	150	92.82 ± 3.12	7.18 ± 3.12	51.78 ± 3.74	2.10 ± 1.21
Isoquercetin	500	150	95.03 ± 1.99	4.97 ± 1.99	48.01 ± 5.58	1.38 ± 0.73
Quercetin	250	150	94.21 ± 2.73	5.79 ± 2.73	48.14 ± 3.68	1.53 ± 0.86
Quercetin	500	150	92.90 ± 1.68	7.10 ± 1.68	49.75 ± 1.70	2.02 ± 0.51

[1)]Each value is Mean ± SD
[2)]Tail moment = tail length × DNA in tail
*Significantly different from the negative control group ($p < 0.5$)
CMC: Carboxymethyl cellulose, EMS: Ethyl methanesulfonate.

Table 3. Results of the Comet assay using cells from the liver of mice treated with isoquercetin and quercetin

Chemical	Dose (mg/kg)	Scored cells	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Tail length (um)	Tail moment[2)]
0.5% CMC		150	97.25 ± 0.47[1)]	2.64 ± 0.47	47.67 ± 1.04	0.51 ± 0.09
EMS	200	150	60.04 ± 11.43*	39.96 ± 11.43*	82.49 ± 6.52*	12.75 ± 6.29*
Isoquercetin	250	150	97.57 ± 0.79	2.43 ± 0.79	43.56 ± 1.40*	0.55 ± 0.20
Isoquercetin	500	150	97.58 ± 0.84	2.42 ± 0.84	44.36 ± 3.12	0.51 ± 0.21
Quercetin	250	150	97.26 ± 0.97	2.74 ± 0.97	41.95 ± 2.00*	0.61 ± 0.27
Quercetin	500	150	97.42 ± 2.04	2.58 ± 2.04	43.14 ± 2.15*	0.61 ± 0.50

[1)]Each value is Mean ± SD
[2)]Tail length × DNA in tail
*Significantly compared with the negative control ($p < 0.5$)
CMC: Carboxymethyl cellulose, EMS: Ethyl methanesulfonate.

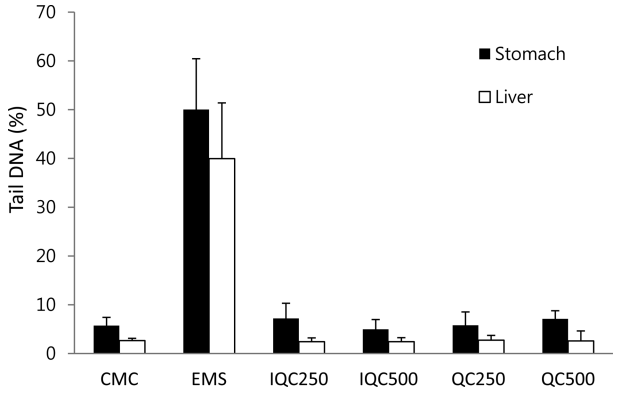

Fig. 2. The changes in tail DNA(%) of the cells from the stomach and liver of mice treated with isoquercetin (IQC) and quercetin (QC). Data are reported as mean ± SD (N = 5). CMC: Carboxymethyl cellulose, EMS: Ethyl methanesulfonate.

하였다. Fig. 2는 위와 간세포의 % tail DNA 값을 군별로 도식화한 것이다. 음성대조군의 % tail DNA 값은 위와 간세포에서 각각 5.71%와 2.64%으로 정상 범위 내로 평가되었고, 양성대조군은 위와 간세포에서 각각 50.03%와 39.96%로 뚜렷하게 증가하였으며 통계적으로 유의성이 있는 것으로 평가되었다($p < 0.05$). 음성대조와 양성대조의 결과에 따라서 본 시험의 타당성이 입증되었다. Isoquercetin 250, 500 및 quercetin 250, 500 mg/kg/day 투여 군에서 위 세포 DNA 손상에 대한 % tail DNA 값은 7.18, 4.97, 5.79, 7.10%로 나타나 두 물질 모두 마우스 위 점막세포의 DNA 손상을 유발하지 않는 것으로 평가되었다(Table 2 & Fig. 2). 마우스 간세포에서 관찰된 DNA 손상정도를 Table 3과 Fig. 2에 제시된 바와 같이 isoquercetin 250, 500 및 quercetin 250, 500 mg/kg/day 투여 군에서 % tail DNA 값으로 평가할 때, 2.43, 2.42, 2.74, 2.58%로 음성대조와의 차이가 관찰되지 않았다. Isoquercetin (250 mg/kg/day)과 quercetin (250, 500 mg/kg/day) 투여 시, 간세포에서 tail length 지표가 음성대조와 비교하여 유의적($p < 0.05$)으로 짧게 나타난 것은 DNA 손상 억제효과로 평가될 수 있으나, tail moment와 % tail DNA에서는 동일 결과가 관찰되지 않는 것으로 보아(Table 3) 생물학적인 의미가 없는 것으로 사료된다.

Table 4. Results of the micronucleus tests using bone marrow cells from the mice treated with isoquercetin and quercetin

Chemical	Dose (mg/kg)	100 × PCE / (PCE + NCE)(%)	% MN-PCE[2)]
0.5% CMC		0.50 ± 0.07[1)]	0.31 ± 0.04
EMS	200	0.51 ± 0.16	0.91 ± 0.20*
Isoquercetin	250	0.51 ± 0.05	0.19 ± 0.06
Isoquercetin	500	0.50 ± 0.02	0.31 ± 0.07
Quercetin	250	0.49 ± 0.07	0.40 ± 0.08
Quercetin	500	0.54 ± 0.02	0.38 ± 0.12

[1)]Each value is Mean ± SD
[2)]MN in 1000 PCE
*Significantly different from the negative control group ($p < 0.5$)
CMC: Carboxymethyl cellulose, EMS: Ethyl methanesulfonate.

소핵시험결과

마우스를 이용한 *in vivo* 소핵시험은 염색체절단으로 생성된 소핵을 골수세포에서 확인하는 실험으로 염색체 구조 이상 여부 즉, clastogen을 평가하는 지표로서 사용된다. 소핵시험결과는 Table 4에 제시되었다. PCE/(PCE + NCE) 비율은 세포독성 지표로 사용되며, 다염성적혈구의 소핵 유발 빈도는 유전독성 지표로 사용된다. 본 시험에서 PCE/(PCE + NCE) 비율은 음성대조, isoquercetin 250, 500 및 quercetin 250, 500 mg/kg/day 투여 군에서 0.50, 0.51, 0.50, 0.49, 0.54로 군 간에 차이를 보이지 않았다. 다염성적혈구의 소핵 유발 빈도는 위와 같은 순서로 0.31, 0.19, 0.31, 0.40, 0.38로 평가되었으며, isoquercetin 또는 quercetin에 의한 유전독성이 관찰되지 않았다. 양성대조 처리 군에서는 다염성적혈구의 소핵이 통계적으로 유의성 있게($p < 0.05$) 증가한 것으로 평가되어 본 실험의 타당성이 입증되었다.

Discussion

Isoquercetin (quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside)은 rutin (quercetin-3-rutinoside)과 함께 천연 식물에 존재하는 quercetin의 배당체로서 알려져 있다. 칠엽수(*Aesculus hippocastanum*, Horse chestnut), 루스쿠스 아쿨레아투스(*Ruscus aculeatus*, Butcher's Broom), 은행나무(*Ginkgo biloba*, Ginkgo), 서양고추나물(*Hypericum perproratum* L, St. John Wort), 빌베리(*Vaccinium myrtillus*, Bilberry) 등의 의약용 식물 뿐 아니라, 채소, 과일, 곡물 및 식물 등에 다량 편재해 있다[1,2]. 장내에서 quercetin으로 전환되어 흡수되기 때문에 quercetin과 동일한 효능을 나타내지만, 흡수율이 quercetin 보다 높기 때문에 quercetin 보다 낮은 허용량을 제안하고 있다[1]. Isoquercetin을 직접 추출하기에는 함유량이 소량이므로 메밀 또는 팥으로부터 추출한 rutin을 효소(α-L-rhamnosidease) 처리하여 제조한다. 이것을 "enzymatically decomposed rutin"이라고 하며 사용한 효소에 따라 95~99.5%의 순도를 갖는다[41]. 본 논문에서는 98% 이상의 고순도 isoquercetin을 구입하여 사용하였다.

본 연구는 isoquercetin의 유전독성 유발능을 평가하기 위하여 수행되었고 isoquercetin이 quercetin의 배당체이므로 quercetin과 비교하여 시험을 수행하였다. 유전독성을 유발하는 기전이 다양하여 평가를 위한 endpoint marker도 다양하다. 국내 및 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인은 *in vitro* 박테리아에서 유전자 돌연변이원성(mutagenicity)을, *in vitro* 포유동물 세포주에서 염색체이상 유발능(clastogenicity) 또는 마우스 림포마 세포주에서 돌연변이원성 및 염색체이상 유발능을 그리고 *in vivo* 설치류시험에서 소핵유발빈도(clastogenicity) 또는 DNA 손상 등을 측정하여 종합적으로 평가하도록 제안하고 있다. Isoquercetin의 유전독성 평가 연구는 제한적이며 quercetin과 함께 *in vitro*에서 양성결과가 보고된 바 있으므로, 본 연구에서는 *in vivo* 시스템에서의 평가에 집중하였다. 따라서 DNA 손상을 평가하는 Comet assay를 사용하여 마우스의 위와 간에서 유전독성을 평가하였고, 염색체 절단을 평가하는 소핵시험을 사용하여 마우스 대퇴골 골수에서 유전독성을 평가하였다. 마우스를 사용한 본 연구의 모든 시험에서 isoquercetin과 quercetin이 유전독성 유발능이 없는 것으로 평가되었다.

본 연구에서 *in vivo* 마우스 소핵시험에서 도출된 quercetin의 음성반응은 이전 보고된 결과들과 일치하는 것이며 quercetin의 위와 간세포에 DNA 손상을 유발하지 않는 음성반응은 본 연구에서 처음 도출된 결과이다. Okada 등은 flavonoids 들의 유전독성을 랫드의 여러 조직에서 소핵을 관찰하여 평가하였는데, grandular stomach, 대장 및 골수를 사용하였고, 세 장기 모두 quercetin에 의한 소핵유발빈도는 증가하지 않았다[31]. Utesch 등은 *In vivo* 랫드의 간에서 Unscheduled DNA synthesis (UDS) assay를 수행하여 음성결과를 보고하였다[40]. 최근 da Silva 등은 quercetin과 rutin의 유전독성을 평가하기 위하여 Comet assay를 수행하여 골수세포에서 DNA 손상 및 소핵유발 빈도를 평가하였다[30]. Quercetin과 rutin이 골수세포의 DNA 손상을 유의적으로 유발하였으나, 소핵은 유도하지 않는 것으로 보고하였다. 기존에 연구에서 quercetin은 대부분 유전독성 음성으로 평가되었으나, 골수세포에서 음성 또는 양성의 결과를 나타내는 것은 골수조직에 산화적 스트레스가 높거나 산화억제 시스템의 소진에 의한 것 또는 간에서의 물질대사 정도의 차이 등이 원인이 될 수 있다.

Isoquercetin의 유전독성 시험결과가 제한적 이유는 quercetin의 배당체이며 소장 흡수 시 quercetin으로 전환되어 흡수되기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 isoquercetin의 능동수송에 의한 높은 흡수율을 고려한다면 안전성에 대한 점검이 필요할 것으로 여겨진다. Valentá 등의 리뷰논문에서 isoquercetin이 박테리아를 사용한 시험에서 복귀돌연변이 양성반응과 포유동물세포주의 염색체이상시험 및 마우스 소핵시험에서 음성결과를 참조하였고 발표되지 않은 결과임을 언급하였다[41]. 또한, isoquercetin은 2-acetoamidofluorenae의 돌연변이성을 증폭시켰고[42] cyclophosphamide에 대한 염색체이상을 억제하였다[43]. Valentová 등은 최근 연구논문에서 quercetin 및 배당체의 복귀돌연변이시험에서 quercetin의 돌연변이원성이 배당체에 의해 감소되며 적절한 용량에서 오히려 산화적 스트레스를 억제하여 돌연변이원성을 감소시키는 것을 확인하였다[44]. 또한 체액면역(humoral immune response) 및 DNA를 보호하는 것으로 보고하였다. Engen 등은 *in vitro* 세포주(Chese hamster ovary, CHO)를 사용하여 SCE의 변화 및 소핵 형성을 관찰하여 그 결과를 보고하였는데, quercetin은 세포성장을 억제하였으며, SCE 출현빈도를 증가시켰고 소핵도 증가시켰다. 반면, glycosylation에 의해 점차적으로 유전독성을 감소시키는 경향이 있었으나, 여전히 isoquercetin 및 rutin에서 유전독성이 유발된 것으로 보고하였다[28]. 천연 배당체보다 합성 배당체가 유전독성이 다소 적은 것으로 평가하였다. Isoquercetin에 대한 최근연구에서 Zan 등은 Artichoke (*Cynara scolymus* L.) 수추출물로 *in vivo* 마우스를 사용하여 유전독성 유발 여부를 평가하였고, 추출물로 2000 mg/kg/day 투여 시 골수세포의 소핵이 유의적으로 유발되었으며, 추출물의 주성분인 isoquercetin, chlorogenic acid, caffeic acid를 원인 물질로 제시하였다. 가장 함유량이 많은 성분이 isoquercetin으로 1.3 mg/g extract 포함되었다[35]. 본 연구에서는 isoquercetin의 경구 투여에 의한 간과 위 세포의 Comet assay는 본 연구에서 처음 수행된 것이며 quercetin과 동일한 노출농도에서 음성결과로 평가되었다. 동일 마우스 골수세포에서 소핵유발빈도 평가시험에서도 음성결과가 도출되었다.

Quercetin과 isoquercetin이 *in vivo* 및 *in vitro* 유전독성 시험에서 다른 결과를 나타내는 것은 물질들의 탁월한 항산화능 또는 생체 내 대사시스템에 기인한 것으로 사료된다. Quercetin은 자가 산화되거나, ortho-semiquinone 또는 ortho-quinone/quinone-methide intermediate (alkylating DNA-reactive intermediate)로 전환되어 ROS를 생성하여 *in vitro* 에서 빠르게 Glutathione sulfate (GSH)를 소진시킬 수 있다[32]. 즉, mutagen 또는 clastogen이기 보다는 pro-oxidant 기전에 의하여 유전독성을 나타내는 것으로 설명된다. 그러나 *in vivo* 생체시스템에서 quercetin은 first-pass(장에서 흡수되어 간에 도달하는 경로)에서 cytochrome P450 대사효소에 의해 유해효과가 감소될 수 있다. 즉 O-methylation 또는 glucuronidation/sulfation 반응에 의해 생성되는 대사물질이 더 이상 유해하지 않고 돌연변이도 유발하지 않을 수 있다. 또한, 장내 흡수비율이 낮아, quercetin의 절대적인 흡수량이 아주 소량이며, 체내에 antioxidation system에 의해 소량의 quercetin의 산화가 억제되기 때문으로 설명할 수 있다. Isoquercetin은 배당체 그대로 흡수되는 경우에도 소장세포 및 간세포에서 생체 전환 반응에 의해 많은 대사물질의 생성이 가능하며[41] isoquercetin의 생체 전환 및 조직분포에 대하여는 아직도 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서는 isoquercetin과 quercetin에 안전성을 검증하기 위하여 *in vivo* 마우스를 사용하였고 위와 간세포는 Comet assay로 분석하여 DNA 손상정도를 평가하였으며, 골수세포는 다염성적혈구에서 소핵을 분석하여 clastogenic 유발능을 평가하였다. 그 결과, isoquercetin과 quercetin은 본 시험조건에서 유전독성을 유발하지 않은 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 논문은 2014년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구(2014-0438)입니다.

국문요약

식물에서 흔히 존재하는 isoquercetin의 유전독성을 평가하기 위하여 최종평가항목인 DNA 절단 및 염색체 손상을 quercetin과 비교 평가하였다. 7주령의 수컷 ICR 마우스를 사용하였고 3일 동안 시험물질을 경구로 투여하였다. 부형제로 0.5% carboxymethylcellulose를 사용하였고 isoquercetin과 quercetin은 각각 250, 500 mg/kg/day로 투여하였으며, 양성대조물질로 ethyl methanesulfonate 200 mg/kg/day를 사용하였다. 일차 투여 후 48시간에 그리고 마지막 투여 후 3시간 내에 부검하였고 조직을 적출하였다. DNA 손상은 Comet assay를 사용하여 위와 간세포에서 관찰하였고, 소핵시험은 골수세포에서 소핵 분석방법을 사용하여 평가하였다. 두 가지 유전독성 시험을 동일 마우스를 사용하여 수행하였다. 그 결과, isoquercetin과 quercetin의 경구 투여는 500 mg/kg/day에서도 위와 간에서 DNA 손상을 초래하지 않았으며 골수세포에서 소핵을 유발하지 않았다. 따라서 본 연구에서 사용한 플라보노이드는 본 실험 조건하에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

References

1. Appleton, J.: Evaluating the Bioavailability of Isoquercetin. *Nat. Med. J.*, **2**, 1-6 (2010).
2. Heim, K.E., agliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572-584 (2002).
3. Murota, k., Hotta, A., Ido, H., Kawai, Y., Moon, J.H., Sekido, K., Hayashi, H., Inakuma, T., Terao, J.: Antioxidant capacity of albumin-bound quercetin metabolites after onion consumption in humans. *Dep. Food Sci.*, 770-8503 (2007).
4. Manach, C., Williamson, Gary., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 230-42 (2005).
5. Ansari, M.A., Abdul, H.M., Joshi, G., Opii, W.O., Butterfield, D.A.: Protective effect of quercetin in primary neurons against Aβ(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 269-275 (2009).
6. Dajas, F., Rivera-Megret F., Blasina, F., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J.A., Costa, G., Echeverry, C., Lafon, L., Heizen, H., Ferreira, M., Morquio, A.: Neuroprotection by flavonoids. *Braz. J. Med . Biol. Res.,* **36**, 1613-1620 (2003).
7. Hyang D.G., Lee, K.H., Kim, H.J., Lee, E.H., Lee, J.y., Song, Y.S., Lee, Y.H., Jin, C.b., Lee, Y.S., Choa, J.s.: N europrotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from Opuntia ficus-indica var. saboten. *Brain Res.*, **965**, 130-36 (2003).
8. Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A., Symons, J.D., Jalili, T.: Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *J. Nutr.*, **137**, 2405-2411 (2007).
9. Chopra, M., Fitzsimons, P.E.E., Strain, J.J., Thurnham, D.I., Howard, A.N.: Nonalcoholic Red Wine Extract and Quercetin Inhibit LDL Oxidation without Affecting Plasma Antioxidant Vitamin and Carotenoid Concentrations. *Clin. Chem.*, **46**, 1162-170 (2000).
10. Hubbard, G.P., Wolffram, S., Lovegrove, J.A., Gibbins, J.M.: Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 2138-145 (2004).
11. Vitor, R.F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A.I., Teixeira, A., Paulo, A.: Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection

against oxidative injury. *J. Ethnopharmacol.*, **93**, 363-370 (2004).
12. Bouriche, H., Miles, E.A., Selloum, L., Calder, P.C.: Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **72**, 195-201 (2005).
13. Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Glvez, J., A Zarzue, A.: *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. *Eur. J. Immunol.*, **35**, 584-592 (2005).
14. UEDA, H., YAMAZAKI, C., YAMAZAKI, M.:A Hydroxyl Group of Flavonoids Affects Oral Antiinflammatory Activity and Inhibition of Systemic Tumor Necrosis Factor-α Production. *Biotechnol. Biochem.*, **68**, 119-125 (2014).
15. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.: The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-51 (2000).
16. Thornhill, S.M., Kelly, A.M.: Natural Treatment of Perennial Allergic Rhinitis. *Altern. Med. Rev.*, **5**, 448-454 (2000).
17. Hollman, P.C.H., van Trijp, J.M.P., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., Katan, M.B.: Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer. Lett.*, **114**, 139-140 (1997).
18. Wolffram, S., Blöck, M., Ader, P.: Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine. *J. Nutr.*, **132**, 630-635 (2002).
19. Ader P., Wessmann A.,Wolffram S.: Bioavailability and metabolism of the floavonol quercetin in the pig. *Free Radical Bilo. Med.*, **28**, 1056-1067 (2000).
20. Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T.: Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.*, **130**, 2765-2771 (2000).
21. He, J., Feng, Y., Ouyang, H.-Z., Yu, B., Chang, Y.-X., Pan, G.-X., Dong, G.-Y., Wang, T., Gao, X.-M.: A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **84**, 189-195 (2013).
22. Pang, Q., Tian, Y., Mi, J., Wang, J., Xu, Y.: Simultaneous determination and pharmacokinetic study of eight components in rat plasma by UHPLC-MS/MS after oral administration of *Hypericum japonicum* Thunb extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **118**, 228-234 (2016).
23. Paulke, A., Eckert, G.P., Schubert-Zsilavecz, M., Wurglics, M.: Isoquercitrin provides better bioavailability than quercetin: comparison of quercetin metabolites in body tissue and brain sections after six days administration of isoquercitrin and quercetin. *Pharm.*, **67**, 991-996 (2012).
24. Chaudhary, A., Willett, K.L.: Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology,* **217**, 194-205 (2006).
25. Bjeldanes, L.F., Chang, G.W.: Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Sci.*, **197**, 577-578 (1977).
26. Schimmer, O., Häfele, F., Krüger, A.: The mutagenic of plant extracts containing quercetin in Salmonella typhimurium TA98 and TA100. *Mutat. Res.*, **206**, 201-208 (1988).
27. Carver, J.H., Carrano, A.V., MacGregor, J.T.: Genetic effects of the flavonols quercetin, Kaempferol, and galangin on chineses hamster ovary cells *in vitro*. *Mutat. Res.*, **113**, 45-60 (1983).
28. Engen, A., Maedaa, J., Wozniaka, D.E., Brentsa, C.A., Bell, J.J., Uesaka, M., Aizawa, Y., Katoa, T.A.:Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutat. Res.*, **784-785**, 15-22 (2015).
29. Taj, S., Nagarajan, B.: Inhibition by quercetin and luteolin of chromosomal alterations induced by salted, deep-fried fish and mutton in rats. *Mutat. Res.*, **369**, 97-106 (1996).
30. da Silva J., Herrmann S. M., Heuser V., Peres W., Possa Marroni N., Gonzalez-Gallego J., Erdtmann B.: Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.,* **40**, 941-947 (2002).
31. Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N., Ohyama, W.: A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats. *Mutat. Res.*, **758**, 87-94 (2013).
32. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C.: A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.,* **45**, 2179-2205 (2007).
33. Hasumura, M., Yasuhara, K., Tamura, T., Imai, T., Mitsumori, K., Hirose, M.: Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 439-444 (2004).
34. Tamura, T., Mitsumori, K., Muto, S., Kasahara, H., Kobayashi, S., Okuhara, Y., Hayashi, M., Nagasawa, T., Onozato, T., Kuroda, J.: Fifty-two week chronic toxicity of enzymatically decomposed rutin in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 2312-2318 (2010).
35. Zan, M.A., Ferraz, A.B.F., Richter, M.F., Picada, J.N., de Andrade, H.H.R., Lehmann, M., Dihl, Emilene Nunes, R.R., Semedo, J., Silva, J.D.: *In vivo* Genotoxicity Evaluation of an Artichoke (Cynara scolymus L.) Aqueous Extract. *J. Food Sci.*, **78**, T367-T371 (2013).
36. Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., and Sasaki, Y. F.: Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*., **35**, 206-221 (2000).
37. The comet assay International Validation Management Team. (2013). Report of the JaCVAM initiative international pre-validation studies of the *in vivo* rodent alkaline Comet assay for the detection of genotoxic carcinogens, version 1.4. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/ testing/Come%

20assay%20revised%20pre-validation%20report%202013.pdf.
38. Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975).
39. OECD Paris. (1997). OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (No. 474).
40. Utesch D., Feige, K., Dasenbrock, J., Broschard, T.H., Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Lines, T.C.: Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. *Mutat. Res.*, **654**, 38-44 (2008)
41. Valentová, K., Vrba, J., Banciřová, M., Ulrichová, J., Křen, V.: Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.*, **68**, 267-282 (2014).
42. Snijman, P.W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, J.r., Gelderblom, W.C.: The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutat. Res.,* **631**, 111-123 (2007).
43. Sekeroglu, V., Aydin B., Sekeroglu, Z.A.: Viscum album L. extract and quercetin reduce cyclophosphamide-induced cardiotoxicity, urotoxidity and genotoxicity in mice. *Asian Pacific J Cancer Prev.,* **12**, 2925-2931 (2011).
44. Valentová, K., Sˇima, P., Rybková, Z., Křižan, J., Malachova, K., Křen, V.: (Anti)mutagenic and immunomodulatory properties of quercetin glycosides. *J Sci Food Agric.,* DOI: 10.1002/jsfa.7251 (2015).