

# Kanser Tedavisinde Kullanılan Ökse Otu (Viscum Album) Ekstraktının Apoptozis Mekanizması

## APOPTOTIC MECHANISM OF MISTLETOE (VISCUM ALBUM) EXTRACT USED IN THE TREATMENT OF CANCER: REVIEW

Esin SAKALLI ÇETİN,<sup>a</sup> Dr. Nurten ÖZÇELİK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyoloji ABD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, ISPARTA

### Özet

Ökse otu ekstraktları uzun zamandır kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavide etkin olan molekülleri lektinler olup bunlar lektin I, lektin II ve lektin III'tür. Değişik hücre tiplerinin lektinlerle inkübasyonları sonucunda; hücre şişmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleer DNA'da kırıkların oluşması gibi apoptotik değişimlerle bağlantılı hücre ölümleri gözlenmiştir. Apoptozis, kaspaz adı verilen proteazlar tarafından kontrol edilmektedir, bunlar çoğu apoptotik yolun parçalayıcı molekülleridir. Memelilerde en az 12 kaspaz vardır, bunlar; başlatıcı (-8, -9, -10) ve sonlandırıcı (efektör) (-3, -6, -7) kaspazlar olmak üzere 2'ye ayrılır. Efektör kaspazlar, DNA tamir enzimi olan poly ADP-riboz polimerazı (PARP), retinoblastoma ve MDM-2 gibi hücre siklusu düzenleyicilerini, lamin, Gas2, gelsolin ve fodrin gibi hücre iskeleti ve nukleusun yapısal proteinlerini, protein kinaz C-δ (PKC-δ) gibi yaşamsal proteinleri ayrıştırarak inaktive eder ve hücre ölümüne neden olurlar. Ökse otu lektinlerinin tümör hücreleri üzerindeki yıkıcı etkilerinin, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'ın aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Ökse otu lektin II, zaman ve doza bağlı olarak, DNA'da kırıklar meydana getirerek U937 hücrelerinde kaspaz -3, -8 ve -9'un aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca ökse otu lektin II ile muamele edilen U937 hücrelerinde, kaspazların katalitik aktivasyonu ile bağlantılı olarak, PARP ve PKC-δ ayrışmaktadır. Ökse otu lektinlerinin apoptotik sürecin aktivasyonunu sağlayacak antikanser özelliklerinin olduğunu belirten önemli kanıtlar bulunmasına rağmen, apoptotik mekanizmanın işleyişi hakkında henüz çok az bilgi elde edilebilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ökse otu; apoptozis; lektinler

**Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27:533-539**

### Abstract

Extracts of mistletoe (*Viscum album*) have been widely used as adjuvant chemotherapy in human cancer for many years. Their therapeutically active molecules are lectin components comprising lectin-I, lectin-II, and lectin-III. Incubation of different cell lines with lectins results in cell death associated with typical apoptotic alterations such as cell shrinkage, chromatin condensation, and internucleosomal DNA cleavage. Recent studies show that apoptosis is essentially controlled by a family of conserved proteases, called caspases, that are currently considered the central executioners of many apoptotic pathways. In mammalian cells, at least 12 different caspase members exist; they are initiator caspases (-8, -9, -10) and effector caspases (-3, -6, -7). Effector caspases cleave and inactivate DNA repair enzyme poly ADP-ribose polymerase (PARP), regulators of the cell cycle such as retinoblastoma protein and MDM-2, and structural proteins of the nucleus and cytoskeleton such as lamins, Gas2, gelsolin, and fodrin, survival proteins such as protein kinase C-δ (PKC-δ) and then cause cell death. The destructive mechanism of mistletoe lectins on tumor cells are mediated by the activation of c-JUN N-terminal kinase (JNK). Mistletoe lectin-II induces ladder pattern DNA fragmentation and activation of caspase -3, -8, and -9 of human myeloleukemic U937 cells, in a time- and dose-dependent manner. Consistent with catalytic activation of protease, both PARP and PKC-δ are also cleaved in mistletoe lectin-II-treated U937 cells. However, little is known about the mechanism of apoptosis induced by mistletoe lectin, even though there is convincing evidence that lectin-mediated anticancer properties are due to an activation of apoptotic processes.

**Key Words:** Mistletoe; apoptozis; lectins

**Y**üzyıllardır insan sağlığına verdiği hizmetten dolayı günümüzde bitkiler ve bitkilerden hazırlanan ilaçlar pek çok

hastalığın tedavisinde tercih edilmektedir.<sup>1</sup> Tıbbi bitkilerden biri olan ökse otu (*Viscum album*) saçak köklerinin yardımıyla köknar, çam, ladin gibi iğne yapraklı; elma, erik, kayısı, kiraz gibi meyve; kavak kestane, kızılgağaç, meşe, söğüt gibi kışın yapraklarını döken ağaçların veya çalılıkların üzerinde yetişen yarı parazit bir bitkidir.<sup>2</sup> Ökse otundan elde edilen farklı ekstraktlar vazodilatör, sedatif, diüretik gibi farmakolojik özellikleri nedeniyle halk arasında şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, sinir

**Geliş Tarihi/Received:** 05.06.2006 **Kabul Tarihi/Accepted:** 21.07.2006

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Esin SAKALLI ÇETİN  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ABD, ISPARTA  
esinsakalli@yahoo.com

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

bozukluğu, damar tıkanıklığı, romatizma ağrıları, çıban ve eklem iltihabı gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>2,3</sup>

Ökse otu bitkisinden hazırlanan özütler tedavi amacıyla kullanılmak üzere Almanya, Avusturya ve İsviçre'deki çeşitli firmalar tarafından tüm dünyaya satılmaktadır. Bu ticari ürünler pek çok araştırmaya konu olmuş ve sahip oldukları aktiviteleri bilim çevrelerince de desteklenmiştir (Tablo 1).<sup>4,22</sup> Özütün hazırlanma şekli ve bitkinin üzerinde yaşadığı konakçı ağacın türüne göre bu özütlerin kimyasal içerik açısından farklılık gösterdiği vurgulanmaktadır.<sup>23</sup>

Ökse otu ekstraktında, 1000'den fazla protein içinde en iyi tanımlanan lektinlerdir. Bunlar farklı şekerlere bağlanabilme özellikleri ile lektin I, II ve III olmak üzere 3 gruba ayrılır. Lektin I, D-galaktoza bağlanır; lektin II, D-galaktoz ve N-asetil galaktozaminin her ikisine; lektin III, N-asetil galaktozamine bağlanır. Bu 3 çeşit lektinin, tümör hücre kültürlerinde oldukça toksik olduğu bildirilmiştir.<sup>24</sup>

**Tablo 1.** Uluslararası patentli ticari ökse otu (V. album) özütleri ve sahip oldukları aktiviteler

Özüt	Aktivitesi	Kaynaklar
Iscador®	Antikanser	8, 9, 10,11, 12
	Doğal öldürücü hücreleri indükleyici	13, 14
	Kemoterapi ve radyasyonun etkisini azaltıcı	15
	Kemoterapi ve radyasyonun etkisini azaltıcı	9, 10
	İmmünmodülatör (immün sistemi düzenleyici)	12
	İmmünmodülatör (immün sistemi düzenleyici)	14, 16
	Sitotoksik	9, 17
	İmmünositümülan	18
	Anti-HIV	
	Antineoplastik	
Helixor®	Antikanser	19
	Doğal öldürücü hücreleri indükleyici	15, 20
	Sitotoksik	21
	İmmünositümülan	22, 23
	İmmünmodülatör	22, 23, 24
Plenosol®	İmmünmodülatör	23
Iserol®	Antikanser	25
	İmmünmodülatör	25
Vysorel®	İmmünmodülatör	23
Eurixor®	İmmünmodülatör	23

Ökse otu lektinleri, heterodimerik bitki toksinlerindedir. A ve B zincirleri olmak üzere 2 farklı glikoprotein zincirden oluşurlar. Bu 2 zincir birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmıştır. B zinciri 34 kDa molekül ağırlığında bir proteindir, şeker bağlayan reseptörleri ile hücre yüzeyindeki şeker uçlarına bağlanarak tüm lektinin hücre içine girmesini sağlar. A zinciri 29 kDa ağırlığındadır, tüm aminoasit zinciri tanımlanmış ve tip 2 ribozom inaktive eden proteinler olarak bilinen bitki toksinlerinden abrin ve ricinle ilişkili olduğu bulunmuştur. Tüm lektinin hücre içine girmesinden sonra, A zinciri 28S rRNA da tek adenozin rezidüsünü depürinize ederek 60S ribozomal alt üniteyi katalitik olarak inaktive eder. A zinciri de ricin gibi, sitotoksik etkisini protein sentezini inhibe ederek gösterir.<sup>25</sup>

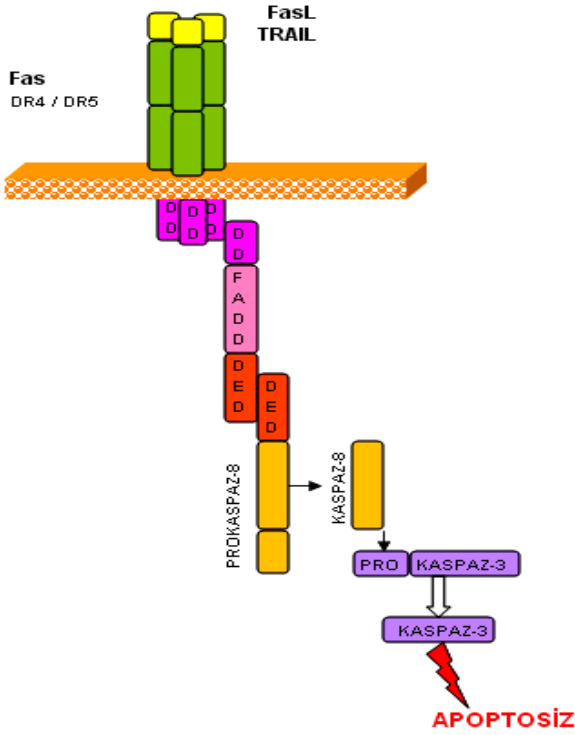
Kore ökse otu (*Viscum album* var *Coloratum*), *Viscum album*'un alt türlerinden biridir. 2000 yılında Park ve ark. yaptıkları çalışma ile Kore ökse otundan izole edilen lektin II'nin, polisakaritin ve viskotoksinin çeşitli kanser hücrelerine etkilerini araştırmışlar ve apoptozisi başlatmada en etkili olan lektin II olduğunu bulmuşlardır. Aynı grup önceki çalışmalarında da, Kore ökse otu lektin II'nin özellikle kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü başlattığını ve normal lenfositlere herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmiştir.<sup>26</sup>

Değişik hücre tiplerinin lektinlerle inkübasyonları sonucunda; hücre şişmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleer DNA'da kırıkların oluşması gibi apoptotik değişimlerle bağlantılı hücre ölümleri gözlenmiştir. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda ökse otu lektinlerin programlı hücre ölümünü başlatan sinyal iletim yolları ve mekanizmaları henüz açıklanamamıştır.<sup>27</sup>

Apoptozisin moleküler mekanizması ile ilgili çalışmalar sonucu, kaspaz (caspase-cysteine-containing aspartate specific proteases) ailesinin doğrudan ya da dolaylı yollardan apoptozisin hem biyokimyasal hem de morfolojik değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır.<sup>28</sup> Memelilerde en az 12 adet oldukları belirlenen kaspazlar, başlatıcı (-8, -9, -10) ve sonlandırıcı (efektör) (-3, -6, -7) kaspazlar olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır.<sup>29</sup> Efektör kaspazlar, DNA tamir enzimi olan PARP, retinoblastoma ve MDM-2 gibi hücre siklusu düzen-

leyicileri, lamin, Gas2, gelsolin ve fodrin gibi hücre iskeleti ve nukleusun yapısal proteinleri, PKC- $\delta$  gibi yaşamsal proteinleri ayrıştırarak inaktive eder ve hücre ölümüne neden olurlar.<sup>30</sup> Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal, hücre içinden (DNA hasarı, hücre içi  $Ca^{++}$  seviyesinde artış, PH'da düşme, metabolik veya hücre siklus bozuklukları) veya hücre dışından (hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve UV ışınlar) gelebilir. Hücre dışından gelen sinyaller ölüm reseptörleri ve adaptör proteinlerle, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile iletilirler. İletilen sinyaller başlatıcı kaspazları aktive eder, aktive olan başlatıcı kaspazlar ise zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler.<sup>29</sup>

Zara bağlı reseptörlerden ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R) olarak adlandırılır ve proapoptotik sinyalleri hücre dışından hücre içine taşır. Tanımlanan 20'den fazla TNFR vardır ve bunlar ölüm domaininin bulunup bulunmamasına göre 2 gruba ayrılır.<sup>31</sup> Ölüm domaini



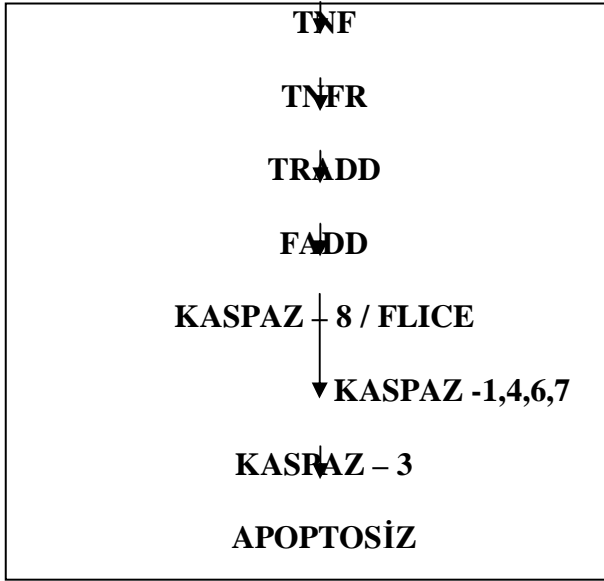
Şekil 1. Fas-fas ligand aracılı apoptozis.

bulunan reseptörler, sinyal iletimini kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise neden olarak gerçekleştirirler. Örneğin; TNFR1 (p55, p60, CD120a) ve Fas (Apo-1, CD 95) ölüm domaini içeren TNFR ilişkili reseptörlerdir, akış aşağı proteinler olan TNF reseptör ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ilişkili ölüm domain (FADD) proteinini aktive ederler. FADD, kaspaz -3 ve -8'i aktive ederek kaspaz aktivasyonunu sağlar, bu durum hedef proteinlerin yıkılmasına ve hücre içeriğinin bozulmasına neden olur.<sup>32</sup>

Hücre dışından gelen sinyallerin oluşturduğu apoptoziste ölüm reseptörleri görevlidir. Fas-fas ligand aracılı apoptozis, Fas (CD95, APO-1) hücre yüzey reseptörü aracılığı ile oluşur. Fas ligandın fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içine bakan kısmında bulunan ölüm domaini, Fas adaptör proteinin (FADD) ölüm domaini ile birleşir ve ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Kompleks başlatıcı kaspaz olan prokaspaz-8'i aktifleştirir. Aktif hale gelen kaspaz-8, sonlandırıcı kaspaz olan prokaspaz-3'ü aktifleştirerek hücreyi apoptozise götürür (Şekil 1).<sup>33</sup>

TNF aracılı apoptoziste, bir sitokin olan TNF'nin TNF1 reseptörleri ile birleşmesi sonucunda, reseptörün ölüm domaini, TNFR adaptör proteinin (TRADD) ölüm domainine bağlanır. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz-8/FLICE'i aktifleştirir ve apoptozise neden olur (Şekil 2).<sup>34</sup>

İç sinyallerle oluşan apoptoziste mitokondri önemli rol oynar. Kemoteropatik ajanların neden olduğu DNA hasarları, radyasyon ve büyüme faktörü eksikliği gibi apoptotik sinyaller mitokondri-nin dış zarında geçirgenlik artışına neden olur. Geçirgenliğin artması, mitokondri-nin 2 zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımı Bcl-2 grubu proteinler tarafından düzenlenir. Grubun antiapoptotik üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> sitokrom c salınımını önlerken, proapoptotik üyeler olan Bax, Bad ve Bid salınımı artırır. Sitokrom c sitoplazmada, apaf-1, kaspaz-9 ve ATP ile birleşir. Bu yapıya apoptozom adı verilir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozise



Şekil 2. TNF aracılı apoptozis.

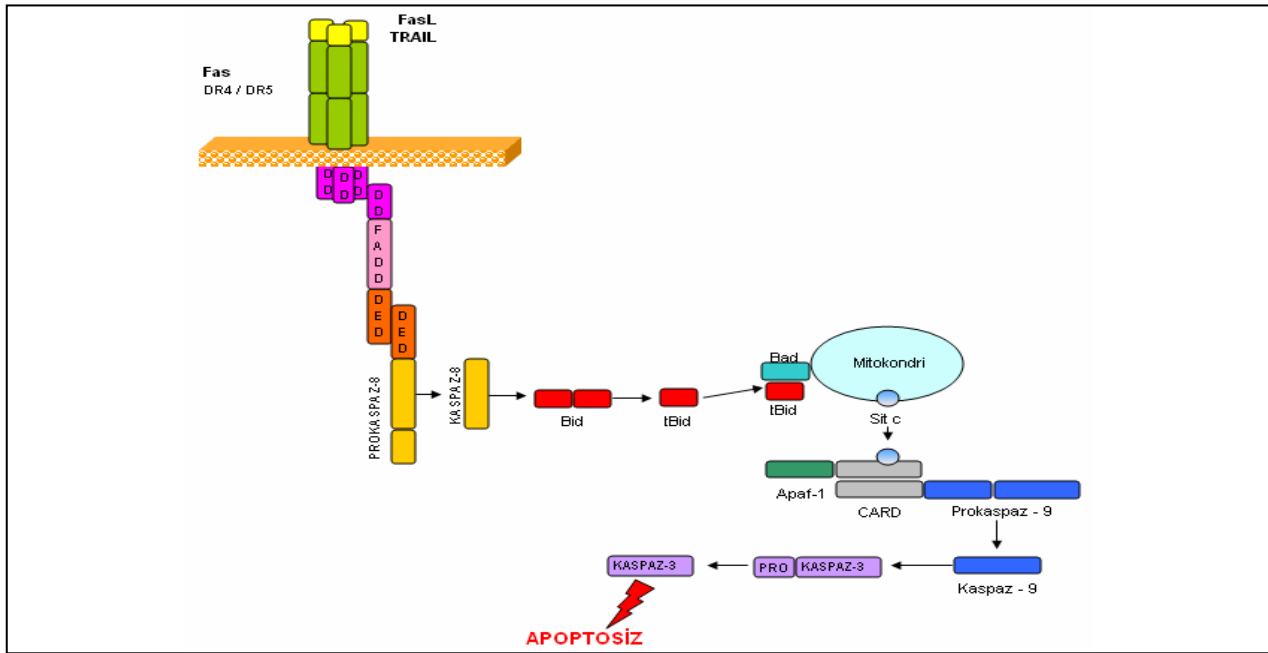
neden olur.<sup>35,36</sup>

Sitokrom c'nin sitozole salınımında CD95 (Fas) reseptörlerine ligand bağlanması ya da hücrelerin kemoteropatik ilaçlar ve UV ile muamele edilmesi gibi değişik apoptotik durumlar etkilidir. CD95 aracılı apoptozisde, reseptörden gelen sinyalle uyarılan kaspaz-8, Bcl-2 protein ailesine bağlı bir proapoptotik faktör olan Bid'i proteolitik olarak ayrıştırır. Aktif hale geçen Bid (tBid) mitokondriye taşınır, zar üzerinde bulunan bir başka proapoptotik protein olan Bad'ı aktive eder, sitokrom c'nin salınımını sağlar ve apoptozomun oluşumuna neden olur. Apoptozom, sonlandırıcı kaspaz-3'ü aktive ederek hücreyi apoptozise götürür (Şekil 3).<sup>37,38</sup>

Ökse otu lektinlerinin tümör hücreleri üzerindeki yıkıcı etkilerinin, JNK'nın aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir.<sup>26</sup> Ökse otu lektin II'nin, zaman ve doza bağlı olarak, DNA'da kırıklar meydana getirerek agaroz jelde merdiven görüntüsü almasına ve U937 hücrelerinde kaspaz -3, -8 ve -9'un aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ökse otu lektin II ile muamele edilen U937 hücrelerinde, kaspazların katalitik aktivasyonu ile bağlantılı olarak, PARP ve PKC-

δ'nin her ikisinin de ayrıştığı bildirilmiştir.<sup>39</sup>

Kemoteropatik ilaçlar, Fas/CD95 sinyal yolunu uyararak veya reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşmasını indükleyerek apoptozise neden olur.<sup>40</sup> İlginçtir ki; lektin II'nin hem kaspaz-8/FLICE hem de kaspaz-9'u aktive ettiği bulunmuştur. Kaspaz-8-proteazın aktivasyonu, CD95 gibi ölüm reseptörlerinin lektin II'nin neden olduğu apoptoziste yer alabileceğini düşündürmüştür. Fakat ökse otu lektin II'nin neden olduğu apoptoziste Fas ve Fas ligandının (FasL) ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Böyle bir durumda da Fas'ın lektin II'nin kendisi tarafından oligomerize edilebileceği ihtimalinin hariç tutulmuş olabileceği üzerinde durulmuştur. Kaspaz-9 proteaz ise apoptozisin sitokrom c yolunun uç kaspazıdır. Bu yol mitokondriyal hasarı kaspaz aktivasyonuna bağlar. Lektin II'nin apoptozise neden olan ROS'un oluşumunu indükleyerek kaspaz-9'u aktive ettiği düşünülmektedir.<sup>41</sup> Kim ve ark.nın bu konuda yaptığı çalışmada; lektin II ile muamele edilen U937 hücrelerinde önemli ölçüde hücre içi hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) meydana geldiği görülmüştür. Artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücre içinde oksidatif stresi arttırdığı ve ROS'un temizlenmesi ile lektin II'nin neden olduğu apoptozisin inhibe edildiği gözlenmiştir. Ayrıca lektin II'nin neden olduğu apoptozisin, redükte glutatyon (GSH), asetilsistein (NAC), ebselen, mn (III) tetrakis (4-benzoic asid), porforin klorid (mnTBP), katalaz ve pirolidin ditokarbamet (PDTC) gibi antioksidanlar tarafından da inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu antioksidanlar aynı zamanda lektin II ile muamele edilmiş insan leukemia (HL-60), Jurkat ve Molt gibi T hücrelerinde de apoptozisi önlemişlerdir. Buradaki bulgular, ROS'un ökse otu lektin II'nin neden olduğu apoptoziste kritik bir role sahip olabileceği yönündedir. Ökse otu lektin II'nin ROS oluşumuna neden olduğu mekanizma henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, Kore ökse otu lektin II tarafından oluşturulan hücre içi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, JNK/SAPK aktivasyonunu, sitokrom c çıkışını ve kaspaz aktivasyonunu içeren hücre içi sinyal yolunu uyardığı bilinmektedir.<sup>42</sup>



Şekil 3. CD95 (Fas) reseptörleri ile sitokrom c salınımı.

Bantel ve ark.nın yaptığı benzer bir çalışmada, ökse otu lektin I (ML I) ile muamele edilen hücrelerde kaspaz -3, -8 ve -9 aktive olmuş ve devamında apoptotik hücre ölümü gerçekleşmiştir. Kaspaz -8'in aktive olması CD95 yolunun ML I'in neden olduğu apoptoziste yer alabileceğini düşündürmüştür. CD95'in uyarılması için de ligandının veya direkt lektinin reseptörle çarpaz bağlanması gerekmektedir. ML I'in neden olduğu apoptoziste CD95'in varlığını ispatlamak için, CD95'e direnç için seçilmiş Jurkat T hücre klonları kullanılmıştır. Bu hücrelerde meydana gelen apoptozisin yabancı tipte hücrelerle benzer olması, ML I'in neden olduğu sitotoksitede CD95'in yer almadığını göstermiştir. Çalışmanın devamında, ML I ile muameleden sonra mitokondri kontrol yolunun başlatılıp başlatılmadığı araştırılmış ve kaspaz -9'un proteolitik aktivasyonu ile ilişkili olarak ML I'in sitokrom c'nin salınımına neden olduğu bulunmuştur. Normalde CD95 ile uyarılan kaspaz 8'in aktivasyonundan sonra Bid sitokrom c salınımına neden olurken, hücrenin ML I'le muamesinden sonra Bid'in parçalandığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, ML I'in kaspaz -3, -8 ve -9'u aktive ettiğini ve apoptozisi ölüm reseptörlerinden bağımsız

olarak mitokondri kontrol yoluyla uyardığını göstermektedir.<sup>43</sup>

Ökse otu lektinin apoptozisi indüklemesi kanser tedavisinde ilginç bir teröpatik strateji sağlar. Park ve ark. yaptıkları çalışmalarda ökse otu lektin II ile muamele edilmiş transforme kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla apoptotik hücre ölümü için daha hassas oldukları bulunmuştur.<sup>26</sup> Flow sitometrik analizler sonucunda, lektin II'nin normal nötrofil ve lenfositlerin apoptozisini indüklediği belirlenmiştir. Lektin II yalnızca U937 hücrelerinde değil aynı zamanda hastalardan alınan akut leukemik hücrelerde, HL-60, Jurkat, RAW 264.7 ve insan kolon kanseri DLD1 hücrelerinde de apoptozisi indüklemiştir.<sup>27</sup> Siegle ve ark. pürifiye edilmiş lektin II'nin insan akciğer hücresi A549'da doksorubisin, sisplatin ve taksol gibi standart kanser ilaçları ile kombine edilerek sitotoksitesinin artırılması yönünde kullanılabileceğini belirterek ökse otu terapisi için yeni klinik bir bakış açısı önermektedir.<sup>44</sup> Ökse otu lektinlerinin apoptotik sürecin aktivasyonunu sağlayacak antikanser özelliklerinin olduğunu belirten önemli kanıtlar bulunmasına rağmen, apoptotik mekanizmanın işleyişi hakkında henüz çok az bilgi elde edilebilmiştir.<sup>39</sup>

**KAYNAKLAR**

1. Ergun F, Deliorman D, Şener B. *Viscum album* L (Ökse otu) (Loranthaceae) bitkisinin morfolojik özellikleri ve Türkiye'deki yayılışı hakkında bazı araştırmalar. *The Herb J Systemat* 1994;1:47-61.
2. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) Türkiye'de Kullanılan Tıbbi Bitkiler. İ.Ü. Yayın no: 3255, Eczacılık Fak. Yayın no: 40. İstanbul: 1984. p.203-4.
3. Yesilada E, Deliorman D, Ergun F, Takaishi Y, Ono Y. Effects of the Turkish subspecies of *Viscum album* on macrophage-derived cytokines. *J Ethnopharmacol* 1998;61:195-200.
4. Kaegi E. Unconventional therapies for cancer: 3. Iscador. Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative. *CMAJ* 1998;158:1157-9.
5. Kleeberg UR, Suci S, Brocker EB, Ruitter DJ, Chartier C, Lienard D, et al. Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 2004;40:390-402.
6. van Wely M, Stoss M, Gorter RW. Toxicity of a standardized mistletoe extract in immunocompromised and healthy individuals. *Am J Ther* 1999;6:37-43.
7. Stoss M, Gorter RW. No evidence of IFN-gamma increase in the serum of HIV-positive and healthy subjects after subcutaneous injection of a non-fermented *viscum album* L. extract. *Nat Immun* 1998;16:157-64.
8. Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anticancer Drugs* 2002;13:373-9.
9. Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, Bruneval P, et al. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: A role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* 2002;8:600-6.
10. Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anticancer Drugs* 2002;13:373-9.
11. Jach R, Basta A, Szczudrawa A. Role of immunomodulatory treatment with Iscador QuS and Intron A of women with CIN1 with concurrent HPV infection. *Ginekol Pol* 2003;74:729-35.
12. Kuttan G, Kuttan R. Reduction of leukopenia in mice by "viscum album" administration during radiation and chemotherapy. *Tumori* 1993;79:74-6.
13. Kovacs E, Kuehn JJ. Measurements of IL-6, soluble IL-6 receptor and soluble gp130 in sera of B-cell lymphoma patients. Does *viscum album* treatment affect these parameters? *Biomed Pharmacother* 2002;56:152-8.
14. Stoss M, van Wely M, Musielsky H, Gorter RW. Study on local inflammatory reactions and other parameters during subcutaneous mistletoe application in HIV-positive patients and HIV-negative subjects over a period of 18 weeks. *Arzneimittelforschung* 1999;49:366-73.
15. Harmsma M, Gromme M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FC. Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 2004;25:1521-9.
16. Kast A, Hauser SP. Helixor--mistletoe preparation for cancer therapy. Documentation No. 19. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1990;79:291-5.
17. Mueller EA, Anderer FA. A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer Immunol Immunother* 1990;32:221-7.
18. Doser C, Doser M, Hulsen H, Mechelke F. Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneimittelforschung* 1989;39:647-51.
19. Bussing A, Stein GM, Stumpf C, Schietzel M. Release of interleukin-6 in cultured B-chronic lymphocytic leukaemia cells is associated with both activation and cell death via apoptosis. *Anticancer Res* 1999;19(5B):3953-9.
20. Stein GM, Berg PA. Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* 1999;4:169-77.
21. Kunze E, Schulz H, Ahrens H, Gabius HJ. Lack of an antitumoral effect of immunomodulatory galactoside-specific mistletoe lectin on N-methyl-N-nitrosourea-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 1997;49:167-80.
22. Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, et al. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm* 2001;16:55-62.
23. Bussing A, Schaller G, Pfuller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Res* 1998;18(6A):4291-6.
24. Ziska P, Gelbin M, Franz H. Interaction of mistletoe lectins ML-I, ML-II and ML-III with carbohydrates. In: Franz H, Bog-Hansen TC, eds. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Berlin: Walter de Gruyter; 1991. p.10-3.
25. Hajto T, Hostanska K, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P. Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:59-67.
26. Park R, Kim MS, So HS, Jung BH, Moon SR, Chung SY, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1685-91.
27. Mockel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung* 1997;47:1145-51.
28. Chang HY, Yang X. "Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases." *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:4:821-46.

29. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: On the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000;14:1514-25.
30. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
31. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
32. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-12.
33. Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-6.
34. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ, ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. 14<sup>th</sup> ed. Lippincott: Williams & Wilkins; 2001.
35. White MK, McCubrey JA. Suppression of apoptosis: Role in cell growth and neoplasia. *Leukemia* 2001;15:1011-21.
36. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999;59(7 Suppl): 1693s-700s.
37. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002;7:433-40.
38. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: Apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003;88: 212-8.
39. Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, et al. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol* 2000;34:349-55.
40. Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998;273:26900-7.
41. Kim MS, Lee J, So HS, Lee KM, Jung BH, Chung SY, et al. Gamma-interferon (IFN-gamma) augments apoptotic response to mistletoe lectin-II via upregulation of Fas/Fas L expression and caspase activation in human myeloid U937 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23: 55-66.
42. Kim MS, Lee J, Lee KM, Yang SH, Choi S, Chung SY, et al. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci* 2003;73:1231-43.
43. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999;59: 2083-90.
44. Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murdter TE. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-I and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21(4A):2687-91.