

## SIGURANȚA TERAPIEI CU EXTRACT DE *VISCUM ALBUM* LA PACIENȚI CU MULTIPLE COMORBIDITĂȚI

TRAIAN ONIU, MIRCEA CAZACU, MELANIA ONIU, OVIDIU FABIAN

Clinica Chirurgie IV, UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

### Rezumat

**Introducere.** Tratatamentul cu extracte de *Viscum album* i se atribuie un efect de stimulare a sistemului imun, ceea ce ar constitui principalul mecanism al acțiunii anti-tumorale și prelungirii ratelor de supraviețuire constatate în studiile experimentale in vivo. Concomitent însă, pentru a putea beneficia în context clinic de efectele anti-tumorale ale acestei imunostimulări, ar trebui demonstrată prioritar lipsa oricăror alte efecte biologice negative, indiferent de natura comorbidităților pacienților.

**Materiale și metodă.** Acesta este un studiu de cohortă, conceput pentru a evalua modificări ale statusului imun și ale altor parametri biologici, la 30 de pacienți spitalizați într-un serviciu de medicină internă, pentru diferite afecțiuni non-neoplazice, consecutiv administrării parenterale a unui extract de vâsc. Protocolul de tratament a constat din administrarea timp de 2 săptămâni a 3 doze săptămânale dintr-un extract apos din 120 mg *Viscum album* plantă totală.

**Rezultate.** Proprietățile imunostimulante ale extractului de vâsc au fost sugerate de creșterea cu 10% a numărului de leucocite, alături de o creștere semnificativă de 17% ( $p=0.02$ ) a numărului limfocitelor. Nu s-au înregistrat modificări semnificative ale concentrației imunoglobulinelor IgA, IgG și IgM ( $p>0.05$ ), hemoglobinei (Hb) ( $p=0.15$ ), proteinelor totale (PT) ( $p=0.72$ ) și fracțiunilor electroforetice ale acestora (EP) ( $p<0.05$ ), vitezei de sedimentare a eritrocitelor (VSH) ( $p=0.94$ ) sau ale proteinei C reactive (PCR) ( $p=0.07$ ).

**Concluzii.** Administrarea extractelor de vâsc este sigură, produce o stimulare a imunității mediate celular și este lipsită de efecte biologice nefavorabile, indiferent de natura comorbidităților pacienților.

**Cuvinte cheie:** vâsc, *Viscum Album*, limfocite, parametri imunologici, comorbidități.

## THE EFFECT OF *VISCUM ALBUM* TOTAL EXTRACT ON THE HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF THE NON-CANCEROUS PATIENTS

### Abstract

**Background.** The treatment with mistletoe extracts is supposed to produce an activation of the immune system which should constitute the main pathway of the anti-tumor properties and of prolonged survivals recorded in experimental in vivo studies. Meanwhile, in order to take advantage of the immunostimulant effect, the lack of any other harmful biological effects should be demonstrated, irrespective of the nature of the patient's comorbidities.

**Materials and Methods.** This is a cohort study designed to assess the changes in the immune status and other biological parameters of 30 inpatients of an internal medicine hospital unit, having various diseases except cancer, following the treatment with mistletoe extracts. The treatment protocol consisted of 3 weekly doses of an aqueous extract from 120 mg *Viscum album*, administered during a 2 week period.

**Results.** The immunostimulant properties of the mistletoe extract treatment were suggested by the 10% increase in white blood cell (WBC) count along with a

significant ( $p=0.02$ ) 17% increase in lymphocyte count. No significant changes were recorded for immunoglobulin (IgA, IgG and IgM) concentrations ( $p>0.05$ ), hemoglobin (Hb) ( $p=0.15$ ), total proteins (TP) ( $p=0.72$ ) and protein electrophoresis fractions (PE) ( $p<0.05$ ), erythrocyte sedimentation rate (ESR) ( $p=0.94$ ) and the C-reactive protein (CRP) ( $p=0.07$ ).

**Conclusions.** The treatment with mistletoe extracts is safe, produces a significant activation of the cellular mediated immunity and is lacking any detrimental biologic effects, irrespective of the nature of the patient morbidities.

**Keywords:** mistletoe, *Viscum Album*, lymphocyte count, immunological parameters, comorbidities.

## IPOTEZA DE LUCRU

Creditate cu efecte imunomodulatoare și citotoxice, preparatele de vâsc își caută de câteva decenii locul în terapia anti-tumorală. Studiile clinice asupra extractelor de vâsc urmăresc ca și principali parametri supraviețuirea, remisiunea sau recidiva tumorală [1,2], calitatea vieții pacienților [3] etc., însă analiza parametrilor biologici, hematologici și imunologici este uzual lăsată în seama studiilor de laborator, pe culturi celulare sau pe animale [4-7]. Proprietățile terapeutice ale anumitor extracte de vâsc au ajuns chiar să fie puse sub semnul întrebării, ridicându-se la un moment dat acuze privind efecte toxice sistemice [8], declanșarea de boli alergice [9-10] și favorizarea creșterii tumorale [11-13]. Îndeosebi pentru preparatul de *Viscum album* – ISOREL, există puține studii clinice, atât privind riscurile administrării, cât și eficiența anti-tumorală [14-16]. Pentru a surprinde eventualele efecte nefavorabile sau dimpotrivă, a demonstra siguranța utilizării Isorel-ului în studii clinice viitoare, este necesară evaluarea preliminară a efectului global asupra status-ului biologic și imun al unei cohorte de pacienți non-neoplazici, dar având alte morbidități ce acoperă întreg spectrul medicinei interne și care se regăsesc frecvent ca și comorbidități la pacienții neoplazici.

## MATERIALE ȘI METODĂ

### Designul studiului

Acesta este un studiu prospectiv de cohortă, menit a evalua efectele hematologice și imunologice ale administrării unui extract total de *Viscum album* unui lot de pacienți întâlnit în mod uzual în secțiile de medicină internă. Probele de sânge venos au fost recoltate la momentul internării și la 1 și 2 săptămâni de la încheierea protocolului de tratament, determinându-se numărul total de leucocite (L) și limfocite (I), imunoglobuline (IgA, IgG, IgM), hemoglobina (Hb), proteinele totale (TP) și fracțiunile electroforetice ale acestora (EP).

### Pacienți și criterii de excludere

Au fost recrutați consecutiv toți pacienții internați

în Secția Medicină Internă a Spitalului Clinic C.F. Cluj-Napoca în decurs de o lună. Au fost excluși pacienții cunoscuți cu afecțiuni care alterează răspunsul imun: cancer, inflamații sau infecții locale sau sistemice, sindrom nefrotic, proceduri medicale invazive sau intervenții chirurgicale recente. Pentru a exclude existența inflamației, au intrat în studiu doar pacienții cu valori normale ale VSH ( $< 25-50$  mm/1-2h) și proteinei „C” reactive (PCR  $< 5$  mg/l). S-a obținut consimțământul informat al pacienților, iar studiul a fost avizat de Comisia de Etică a Spitalului Clinic C.F. Cluj-Napoca.

### Protocolul de tratament și evaluare

Preparatul de vâsc utilizat a fost Isorel® A (Abietis - *Viscum album* crescut pe brad), concentrația 60 (fiola conținând 1 ml extract apos obținut din 60 mg plantă totală de vâsc, uzual specificată ca și 60 mg/ml) (Novipharma GmbH. – Austria).

Administrarea a constat din 2 fiole Isorel® A dizolvate în 250 ml ser fiziologic și administrate în perfuzie iv. în decurs de 1 oră, de trei ori în decursul unei săptămâni (zilele 1,3,5), timp de 2 săptămâni.

Prelevarea probelor sangvine pentru analiza parametrilor hematologici, biochimici și imunologici a fost făcută înaintea începerii tratamentului și la 1 și, respectiv, 2 săptămâni după încheierea acestuia.

### Analiza statistică

Pentru analiza statistică a fost utilizat softul Statistica 6.0 for Windows [StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com]. Semnificația variației parametrilor pre- și post-tratament s-a făcut prin *t*-test, o valoare a  $p<0.05$  fiind considerată statistic semnificativă.

## REZULTATE

Un număr de 30 de pacienți au corespuns criteriilor de includere. Majoritatea afecțiunilor pentru care au fost spitalizați au fost cardio-vasculare, digestive și metabolice (Tabel I). Majoritatea pacienților aveau asociate 3 sau mai multe boli.

Protocolul de tratament a fost bine tolerat de către toți pacienții. Nu au existat reacții adverse, incidente sau complicații datorate administrării preparatului sau în decursul tratamentului, inclusiv timp de 2 săptămâni după

**Tabel I.** Bolile pacienților grupate pe tipuri de afecțiuni.

<b>Afecțiuni cardio-vasculare</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HTA (n=7)</li> <li>• Cardiopatie ischemică (n=7)</li> <li>• Insuficiență venoasă cronică (n=1)</li> </ul>	<b>Afecțiuni endocrine</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotiroidism (n=1)</li> <li>• Gușă nodulară (n=1)</li> </ul>
<b>Afecțiuni metabolice</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Obezitate (n=4)</li> <li>• Dislipidemie (n=4)</li> <li>• DZ (diabet zaharat) (n=2)</li> </ul>	<b>Afecțiuni urologice</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Litiază urinară (n=3)</li> <li>• Adenom de prostată (n=1)</li> </ul>
<b>Alte afecțiuni</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nevroză (n=1)</li> <li>• Spasmofilie (n=2)</li> <li>• Migrenă (n=2)</li> <li>• Spondiloză (n=2)</li> </ul>	<b>Afecțiuni digestive</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Boală de reflux gastro-esofagian (n=2)</li> <li>• Ulcer gastro-duodenal (n=3)</li> <li>• Steatofibroză hepatică (n=2)</li> <li>• Pancreatită cronică (n=3)</li> <li>• Diskinezie biliară (n=3)</li> <li>• Colecistită cronică (n=1)</li> </ul>

**Tabel II.** Modificări ale parametrilor imunologici și ale altor parametri biologici după tratamentul cu extract de *Viscum album*.

Parametri biologici	Pre-tratament	Post-tratament	p
<b>Leucocite</b> (nr/mm <sup>3</sup> )	6660	7327	0.09
<b>Limfocite</b> (nr/mm <sup>3</sup> )	2113	2475	0.02
<b>Imunoglobuline *</b>			
IgA	394	399	0.92
IgG	1734	1874	0.38
IgM	218	212	0.83
<b>Proteine totale**</b> (g/dl)	6.64	6.69	0.72
Albumine	3.79	3.71	0.49
Alfa1	0.25	0.26	0.73
Alfa2	0.60	0.65	0.44
Beta	0.69	0.76	0.051
Gama	1.29	1.34	0.47
<b>VSH</b> (mm/1-2 h)	13/26	13/26	0.94
<b>Hemoglobina</b> (g/dl)	12.1	12.5	0.15
<b>Proteina "C" reactivă</b> (% pacienți cu valoare normală)	100	93	0.07

Analiza efectuată pe lotul de 30 de pacienți cu excepția \* pe 11 pacienți și \*\* pe 14 pacienți

încheierea acestuia. Au fost obținute următoarele rezultate ale variației parametrilor biologici (Tabel II).

#### *Leucocitele*

Determinarea leucocitelor s-a făcut la 30 de pacienți. Valoarea medie înainte de tratament a fost 6600 leucocite/mm<sup>3</sup> (între 3800-9400 leucocite/mm<sup>3</sup>) și a crescut la 7326 leucocite/mm<sup>3</sup> (între 3600-9700 leucocite /mm<sup>3</sup>) după tratament. Cu toate că este o creștere de 10%, aceasta nu este statistic semnificativă.

Numărul limfocitelor a crescut de la o valoare medie dinainte de tratament de 2113 limfocite/mm<sup>3</sup> (între 1118-3478 limfocite/mm<sup>3</sup>), la o valoare medie post-tratament de 2475 limfocite/mm<sup>3</sup>. Această creștere de 17% este statistic semnificativă (p=0.02).

#### *Imunoglobulinele*

Determinarea imunoglobulinelor serice a fost făcută la primii 11 pacienți. Nu s-au înregistrat modificări semnificative ale titrului acestora după 2 săptămâni de tratament: IgA de la 394 la 399 UI/ml (p=0.92), IgG de la

1734 la 1874 UI/ml (p=0.38) și IgM de la 218 la 212 UI/ml (p=0.83). Din acest motiv, determinarea nu a mai fost efectuată la restul pacienților.

#### *Hemoglobina*

O creștere nesemnificativă de 3% a fost constatată în concentrația hemoglobinei (valoarea medie a celor 30 de pacienți a crescut de la 12,1 la 12,5 g/dl, p=0,15).

#### *Proteinele totale și electroforeza proteinelor serice*

Evaluarea s-a făcut la 14 pacienți. Valoarea medie pre-terapeutică a proteinelor totale (PT=6,64 g/dl) și a fracțiunilor electroforetice: albumine, alfa 1, alfa 2, beta și gama-globuline, nu s-a modificat după tratament (PT=6,69 g/dl, p=0.7 și "p" cu valori de la 0.051 la 0.73 pentru fracțiunile electroforetice).

#### *VSH (viteza de sedimentare a hematiilor)*

Valoarea medie a acestui parametru a rămas neschimbată de-a lungul duratei studiului, valori medii de 13-26 mm/1-2 h fiind înregistrate atât inițial, cât și după 2 săptămâni de tratament.

## DISCUȚII

Activarea complexă a sistemului imun și, implicit, și a componentelor anti-tumorale ale acestuia constituie fundamentul rezultatelor favorabile obținute în studiile clinice, și anume ameliorarea supraviețuirii pacienților cu diferite cancere prin tratament cu extracte de *Viscum album*.

Demonstrarea detaliată a unei asemenea stimulări globale este dificilă, datorită multitudinii de componente celulare și umorale implicate. La pacientul neoplazic, există în plus o multitudine de factori datorati actului chirurgical și terapiei adjuvante, sau datorati progresiei bolii, care modifică și nu permit cunoașterea amplitudinii pe care substanțele vâscului le pot avea asupra unui sistem imun integru.

Studiul a dovedit o creștere semnificativă a limfocitelor în condițiile utilizării unor doze uzuale de extract de vâsc (3 x 120 mg Isorel A) timp de 2 săptămâni. Aceasta s-a datorat atât unei creșteri globale de 10% a leucocitelor, cât și creșterii proporției limfocitelor în cadrul numărului total de leucocite, de la 32 la 34%.

Acest rezultat este în deplină concordanță cu cercetări anterioare efectuate în Clinica Chirurgie IV a UMF Cluj-Napoca de către autor, care a demonstrat că scăderea inițială a limfocitelor în perioada postoperatorie, la pacienți cu cancer colorectal, a fost urmată de o creștere semnificativă cu revenirea lor până aproape de valorile inițiale în decurs de 2-3 săptămâni doar la pacienții supuși tratamentului postoperator cu extract de *Viscum album*. La pacienții din grupul de control, revenirea limfocitelor la valorile inițiale s-a făcut în decursul a 2-3 luni. Creșterea limfocitelor indusă de extractul de vâsc a interesat subtipurile CD4, CD8 și NK, iar valorile celulelor NK s-au corelat cu rata supraviețuirii la 3 ani.

Studiul a înregistrat modificări minime ale imunoglobulinelor (IgA, IgG, IgM). Se cunoaște că diferitele preparate de vâsc sunt în măsură să inducă formarea diferitelor imunoglobuline în funcție de compoziția extractului (prezența și tipul lectinelor, prezența veziculelor lipidice etc.); în general se formează anticorpi anti-lectinici (anti-ML), de obicei de tip IgG, dar uneori și IgA sau IgE, cel mai rar găsindu-se IgM. Titruri detectabile ale acestor anticorpi apar după 3-12 săptămâni de la administrare și nu sunt foarte mari [17-20]. Rolul avut de anticorpii anti-ML in vivo și mai ales în răspunsul pacienților cu tumori la tratamentul cu vâsc este în prezent incert; se presupune că toxicitatea lectinelor vâscului este inhibată de acești anticorpi, presupunere aflată în concordanță cu faptul empiric că, pe parcursul unei terapii cu vâsc, pot fi aplicate doze tot mai mari, și că extractele de vâsc cu conținut mare de lectină sunt de asemenea tolerate, în ciuda înaltei toxicități demonstrate in vitro. Compoziția lectinică a ISOREL este cunoscută, nu însă și profilul de anticorpi pe care îl declanșează la subiecții umani (așa cum se cunosc la alte preparate de vâsc – Helixor, Iscador, Anobaviscum);

într-un viitor studiu vom determina acest profil în dinamică, pe parcursul unei terapii anti-tumorale continue de luni de zile și îl vom corela cu analiza supraviețuirii pacienților.

Imunoglobulinele E nu au fost determinate, întrucât există suficiente studii în literatură care au arătat că răspunsul acestora la extractele de vâsc este aleatoriu și nu se corelează cu reacții alergice sau de hipersensibilitate [21].

Valoarea hemoglobinei nu a fost semnificativ influențată de tratament. Se presupune însă că hematopoieza poate fi influențată de lectinele vâscului. Lectina din vâsc I (Mistletoe Lectin I - ML I) se leagă de celulele stem hematopoietice CD34<sup>+</sup> din măduva osoasă și cu toate că ML I însăși nu are influență asupra proliferării, ea intensifică semnificativ proliferarea prin factori de creștere (eritropoetină, factorul celulei stem, G-CSF, GM-CSF, IL-3), atât a celulelor precursorare eritropoietice, cât și a celulelor precursorare granulocito-macrofage [22].

La fel de importantă ca și evidențierea inducerii proliferării limfocitare a fost demonstrarea lipsei altor efecte biologice negative, toxice, alergice etc. Acest studiu preliminar nu a detectat modificări semnificative ale fracțiunilor electroforetice ale proteinelor, eritrocitare sau plachetare, ale VSH sau proteinei C reactive. La aceasta se adaugă lipsa efectelor secundare, incidentelor sau complicațiilor legate direct de administrarea extractului de vâsc (reacții alergice sau șoc anafilactic) sau care să survină în decursul întregii perioade de spitalizare sau convalescență la domiciliu, urmărită până la 2 săptămâni de la încheierea tratamentului cu Isorel. Mai mult, majoritatea pacienților au raportat o ameliorare a stării generale, a fatigabilității, somnului și dispoziției psihice; acești parametri nu au fost însă incluși de la început în protocolul de cercetare, motiv pentru care nu au fost cuantificați printr-o metodologie adecvată. Există însă studii recente și importante care au documentat acest aspect al „îmbunătățirii calității vieții”, după o durată de tratament în medie de 6 săptămâni [3].

## CONCLUZII

Administrarea intravenoasă, în perfuzii, a extractului total de *Viscum album* – ISOREL este sigură, fără efecte adverse, fără fenomene anafilactice sau toxice, fără agravarea morbidităților non-neoplazice asociate ale pacienților. Aceasta nu produce modificări nefavorabile semnificative ale parametrilor biologici, însă realizează o stimulare a imunității mediate celular (stimularea limfocitelor), care reprezintă de altfel o premiză a efectului anti-tumoral care este așteptat de la acest preparat.

## Bibliografie

1. Grossarth-Maticek R, Ziegler R. Randomized and non-randomized prospective controlled cohort studies in matched pair design for the long-term therapy of corpus uteri cancer patients with a mistletoe preparation (IsCADOR®). Eur J Med Res, 2008; 13, 107-120

2. Kleeberg U R, Suciu S, Bröcker EB, et al. Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial: rIFN- $\alpha$ 2b versus rIFN- $\gamma$  versus Iscador® M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer*, 2004; 40, 390-402
3. Piao B K, Wang YX, Xie GR, et al. Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial. *Anticancer Res*, 2004; 24, 303-309
4. Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E. Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res*, 2002; 22 (3): 1399-1407
5. Stein GM, Schaller G, Pfüller U, et al. Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res*, 1999; 19(2A): 1037-1042
6. Cebović T, Spasić S, Popović M. Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells in vivo. *Phytother Res*, 2008; 22(8): 1097-1103
7. Braun JM, Ko HL, Schierholz JM, et al. Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models. *Anticancer Res*, 2002; 22(6C): 4187-4190
8. Ernst E. Mistletoe as a treatment for cancer. *Br Med J*, 2006; 333, 1282-1283
9. Bauer C, Oppel T, Rueff F, et al. Anaphylaxis to viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*) extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2005; 94, 86-89
10. Hutt N, Kopferschmitt-Kubler M, Cabalion J, et al. Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe (*Viscum album* L.). *Allergol Immunopathol*, 2001; 29, 201-203
11. Gabius H-J, Darro F, Rimmelink M, et al. Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts. *Cancer Investigation*, 2001; 19, 114-126
12. Kunze E, Schulz H, Adamek M, et al. Long-term administration of galactoside-specific mistletoe lectin in an animal model: no protection against N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats and no induction of a relevant local cellular immune response. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000; 126, 125-138
13. Silver S. Trial results warn of dangers in the use of mistletoe extract. *Lancet Oncol*, 2001; 2, 196
14. Jurin M, Zarković N, Hrzenjak M, et al. Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album* L. preparation Isorel. *Oncology*, 1993; 50(6): 393-398
15. Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, et al. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm*, 2001; 16(1): 55-62
16. Enesel MB, Acalovschi I, Grosu V, et al. Perioperative application of the *Viscum album* extract Isorel in digestive tract cancer patients. *Anticancer Res*, 2005; 25(6C): 4583-4590
17. Stein GM. Untersuchungen zur Interaktion von Mistelantigenen mit dem Immunsystem. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1995, 1-216
18. Stein GM, von Laue HB, Henn W, et al. Human anti-mistletoe lectin antibodies. In COST 98. Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. (Eds. S. Bardocz, U. Pfüller, A. Pusztai), Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1998; 168-175
19. Stein GM, Meink H, von Laue HB, et al. Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy. *Eur.J.Med.Res.*, 1998; 3, 194-202
20. Klein R, Claßen K, Berg PA, et al. In vivo-induction of antibodies in mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: A randomized double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. *Eur.J.Med.Res.*, 2002; 7, 155-163
21. Fischer S, Claßen K, Klein R, et al. Immunologische Reaktion von Tumor-Patienten innerhalb der ersten 6 Monate einer Mistelbehandlung. In *Die Mistel in der Tumprtherapie. Grundlagerecherche und Klinik*. (Eds. R. Scheer, R. Bauer, H. Becker, P.A. Berg, V. Fintelmann), KVC Verlag, Essen, 2001; 459-471
22. Vehmeyer K, Hajto T, Hostanska K, et al. Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells. *Eur.J.Haematol.*, 1998; 60, 16-20