
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Tratamentul multimodal al cancerului colorectal. Imunoterapia ca parte integrantă a protocolului terapeutic

Doctorand **Traian-Dorin, Oniu**

Conducător de doctorat **Mircea, Cazacu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Bazele moleculare ale imunomodulării prin Extracte de <i>Viscum album</i>	19
1.1. Botanica vâscului – “Numic nu este normal”	19
1.2. Preparate de vâsc	20
1.3. Componentele cu efect antitumoral din extractele de vâsc	20
1.3. Mecanismul de acțiune al extractelor de vâsc	30
2. Terapia cu extracte de vâsc prin prisma medicinei bazate pe dovezi – Studiile clinice asupra imunomodulării cu extract de vâsc în cancerul colorectal	31
2.1. Introducere	31
2.2. Studii comparative prospective	32
2.3. Studiile comparative retrospective	38
2.3. Studii de cohortă și serii de cazuri	45
2.4. Sinteze sistematice (<i>Systematic Reviews</i>) ale studiilor privind extractul de vâsc	47
2.5. Concluzii	47
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	51
2. Metodologie generală	53
3. Studiul 1 – Efectul extractului total de <i>Viscum album</i> asupra parametrilor hematologici și imunologici ai pacienților non-neoplazici	57
3.1. Ipoteza de lucru	57
3.2. Material și metodă	58
3.3. Rezultate	59
3.4. Discuții	63
4. Studiul 2 – Reacția imunologică a pacienților cu cancer colorectal tratați cu extractul total de <i>Viscum album</i>	67

4.1. Ipoteza de lucru	67
4.2. Material și metodă	68
4.3. Rezultate	73
4.4. Discuții	76
5. Studiul 3 – Efectul extractului total de <i>Viscum album</i> asupra supraviețuirii pacienților cu cancer colorectal	79
5.1. Ipoteza de lucru	79
5.2. Metodă	79
5.3. Rezultate	86
5.4. Discuții	109
6. Concluzii generale	113
REFERINȚE	117

CUVINTE CHEIE

Cancer colorectal, imunoterapie, *Viscum album*, extracte de vâsc, lectinele vâscului, vâscotoxine, ISOREL, tratament chirurgical, chimioterapie, supraviețuire, trial clinic randomizat, TIL- tumor infiltrating lymphocytes, infiltrat inflamator intratumoral, infiltrat inflamator peritumoral, TNF α -Tumor necrosis factor alpha, factorul de necroză tumorală alfa

INTRODUCERE

Actuala teză este menită să contribuie la obținerea unor răspunsuri în domeniul de graniță pe care îl reprezintă imunoterapia cu extracte de *Viscum album*.

Extractele de *Viscum album* au început să fie testate ca și tratamente antineoplazice după anul 1920, la propunerea lui Rudolf Steiner, fondatorul curentului filozofic antroposofic, fiind un element terapeutic important al medicinei antroposofice. Rezultatele acestor încercări timpurii nu au fost însă niciodată prezentate într-o manieră științifică medicală, ridicându-se cel mult la nivelul unor „case-reports”.

Deși studiile preclinice au descifrat progresiv în ultimele decade atât conținutul în substanțe biologice active ale extractelor de vâsc cât și o multitudine de mecanisme imunologice antineoplazice, studiile clinice asupra efectelor oncologice care datează anterior de anii '90 sunt irelevante din lipsa unei metodologii adecvate de cercetare

științifică medicală și au o actualitate redusă datorită neutilizării chimioterapiei sau utilizării de protocoale de chimioterapie vechi în acea perioadă în asociere cu extractele de vâsc.

În ultimele 2 decenii, deși metodologiile de cercetare științifică medicală au fost mai bine definite, oferind instrumente moderne de studiu, preocuparea pentru imunoterapia cu extracte de vâsc a scăzut pe măsura ce interesul comunității medicale oncologice s-a deplasat spre noi agenți chimioterapici și agenți modificali ai răspunsului biologic. Nu s-au realizat astfel studii pe măsura posibilităților, interesul pentru vâsc aprinzându-se doar sporadic de către imunologi, biologi și cercetatori din domeniul medicinei alternative sau complementare iar majoritatea studiilor au rezultat cel mai adesea din preocupările firmelor producătoare de preparate de extracte de vâsc.

În aceste condiții, evaluarea acestui tip particular de terapie imunologică într-un domeniu concret al patologiei oncologice cum este cancerul colorectal se poate baza prea puțin pe datele preclinice și studiile clinice perimate, necesitând practic refacerea întregului demers, începând cu studii de fezabilitate, studii imunologice și culminând cu studii de supraviețuire și calitate a vieții. Astfel, ne propunem în cadrul acestei teze de doctorat realizarea câtorva studii, cu complexitate progresiv crescândă, care să analizeze succesiv aspectele anterior menționate:

- I. În capitolul 1 al primei părți au fost identificate în literatură cunoștințele actuale asupra tuturor componentelor chimice identificate în extractele de vâsc, asupra tuturor mecanismelor imunologice și biologice pe care acestea le exercită in vitro sau in vivo, conform unei multitudini de studii preclinice.
- II. Capitolul 2 al primei părți este un review exhaustiv al tuturor studiilor clinice cunoscute privind tratamentul cu diferite extracte de vâsc al cancerului colorectal, în care concluziile studiilor au fost evaluate prin prisma medicinei bazate pe dovezi.
- III. Studiul 1 este un studiu de fezabilitate care urmărește să surprindă eventualele efecte nefavorabile sau dimpotrivă, să demonstreze siguranța utilizării preparatului de vâsc Isorel, în vederea studiilor clinice care au urmat. S-a evaluat preliminar efectul global al preparatului asupra status-ului biologic și imun al unei cohorte de pacienți non-neoplazici dar având o serie de alte morbidități ce acoperă întreg spectrul medicinei interne și care se regăsesc uzual ca și co-morbidități la pacienții cu cancer colorectal.
- IV. Studiul 2 explorează modificările inflamatorii locale, intra- și peri-tumorale care apar după tratamentul cu extract de *Viscum album* și de asemenea dinamica perioperatorie a nivelului seric al TNF alfa în condițiile acestei

imunoterapiei. Aceste aspecte sunt recunoscute ca fiind factori de prognostic pentru cancerul colorectal, motiv pentru care studiul urmărește să stabilească dacă beneficiile de supraviețuire a pacienților cu cancer colorectal obținute prin terapia cu extract de *Viscum album* au la bază o modificare a unora dintre acești factori prognostici.

- V. Studiul 3 evaluează, sub forma unui trial clinic randomizat, dacă imunoterapia cu extract de vâsc, aplicată complementar tratamentului standard modern chirurgical și oncologic al cancerului colorectal, influențează supraviețuirea acestor pacienți.

STADIUL ACTUAL AL CUNOATERII

I. Bazele moleculare ale imunomodulării cu extracte de *Viscum album*

Vâscul este o plantă extraordinară în sensul cel mai literar al termenului. Forțând o ierarhizare se poate spune că este una dintre cele mai neobișnuite, particulare, speciale plante care cresc în Europa. Nu este dependent de ciclul solar anual producând fructele iarna, ignoră particularitățile solului fiind dependent doar de planta gazdă dar ignorându-i și acesteia ritmurile biologice, nu secătuieste planta pe care o parazitează... și lista particularităților ar putea continua pe masura ce ne adâncim în detaliile biologiei lui.

Principalele componente chimice ale *Viscum album* sunt lectinele, viscotoxinele, oligo- și polizaharidele, alcaloizii și veziculele lipidice, dar lista componentelor conținute se extinde cu încă peste 100 de substanțelor chimice: proteine și glicoproteine, flavonoide, amine biogene, derivați ai colinei, lignani, derivați fenilpropanici, acizi fenolcarboxilici, terpeni, fitosteroli, aminoacizi liberi, ADN, ARN și multe altele.

Din studiul extractelor de vâsc au rezultat o serie de constatări care subliniază complexitatea compoziției, diversitatea mecanismelor de acțiune și interacțiunile dintre componente: (1) În extrasele de vâsc sunt identificabile o multitudine de principii active antitumorale; (2) Fiecare substanță a vâscului are mecanisme de acțiune antitumorală diferite; (3) Clase de substanțe diferite par să acționeze concertat asupra unui tip de tumoră/ pacient; (4) Substanțele vâscului își pot modifica reciproc efectele, pot interacționa sinergic și antagonic; (5) Efectul extractului total nu a putut fi redus până în prezent la efectul unei singure substanțe; (6) Modalitatea de preparare a extractului de vâsc poate determina formarea de complexe de substanțe și modificarea caracteristicilor biologice singulare; e posibil ca acest proces să fie unul din cele mai relevante în dobândirea proprietăților anti-tumorale.

Principalele mecanisme de acțiune ale extractelor de vâsc sunt • Stimularea sistemului imun (creșterea diferitelor subtipuri de limfocite T sau NK) • Stimularea eliberării de citokine precum interleukina-1, interleukina-6 și factorul de necroză

tumorală-alfa (TNF α) • Efect citotoxic direct asupra celulelor tumorale • Stabilizarea și protecția ADN-ului celulelor normale expuse chimioterapiei • Diminuarea efectelor secundare ale terapiilor oncologice convenționale (refacerea maduvei hematopoetice, a leucocitelor etc. • Recuperarea pierderii ponderale datorate efectului cașectizant al tumorilor

II. Terapia cu extracte de vâsc prin prisma medicinei bazate pe dovezi – Studiile clinice asupra imunomodulării cu extract de vâsc în cancerul colorectal

Se cunosc până la ora actuală 123 de studii clinice asupra eficacității terapeutice a preparatelor antroposofice de vâsc la pacienții cu cancer. Acestea au fost identificate prin căutare în bazele de date: AMED, Biosis Previews, Cinahl, Cochrane Library, Embase, Medline/Premedline, NLM Gateway, Science Citation Index, National Centre for Complementary and Alternative Medicine.

În domeniul cancerului colorectal au fost identificate 6 studii comparative prospective, dintre care 4 sunt trialuri randomizate, 8 studii comparative retrospective și 2 studii de cohorta.

Cel mai mare nivel de evidenta îl au cele 6 studii comparative prospective; ele au fost realizate între 1986-2007 și au comparat în total un număr de 190 pacienți tratați cu extracte de vâsc versus 174 pacienți de control. Din acestea rezultă:

- Ameliorarea supraviețuirii: 6 studii: semnificativă (3), tendință(1), fără calculul semnificației (1), în curând(1)
- Nici un studiu nu raspuns intrebarilor legate de rata recidivelor si intervalul liber de boala.
- Remisia tumorală: 2 studii: semnificativă dar cu incertitudini asupra metodologiei(1), fără calculul semnificației(1)
- Ameliorarea calității vieții: 3 studii: semnificativa(1), tendință(1), fără date concrete(1)
- Reducerea efectelor secundare al tratamentelor conventionale: 2 studii: semnificativă(2)(NK după chirurgie și toxicitatea chimioterapiei)
- Toleranța la tratament a fost bună, cinci studii (în care administrarea s-a făcut subcutanat și în perfuzie i.v.) precizând lipsa de reacții locale sau sistemice.

Studiile comparative retrospective se întind pe perioada 1969-2007 și însumează 1925 pacienți tratați cu extracte de vâsc.

Până la momentul elaborării prezentei teze, prin prisma medicinei bazate pe dovezi, cele mai solide date asupra efectelor extractelor de vâsc în tratamentul cancerului colorectal se referă la ameliorarea calității vieții și creșterea toleranței față de terapiile convenționale, efecte care se obțin în condiții de perfectă siguranță întrucât tratamentul se bucură de o inocuitate absolută, cu reacții adverse nule sau minime și nu presupune niciun risc. De asemenea, un beneficiu de supraviețuire a fost

raportat de către multe studii, însă nu în afara oricăror critici. Remisii tumorale au fost prezentate, uneori în detaliu, dar în studii non-randomizate și par să depindă de tipul de extract, dozaj și calea de administrare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Metodologie generală

Pacienți

Cazurile utilizate pentru diferitele studii ale tezei au fost recrutate dintre pacienții care s-au adresat Clinicilor de medicină internă IV și chirurgie IV ale UMF Cluj-Napoca, în cadrul Spitalului Universitar C.F. Cluj –Napoca, începând cu octombrie 1997 și până în octombrie 2005.

Extractul apos total din *Viscum album* – ISOREL

Preparatul ISOREL care a fost utilizat în toate studiile acestei teze reprezintă un produs original al firmei Novipharm G.m.b.H. – Austria, fiind un extract apos obținut la rece din planta totală de *Viscum album* L. – vâscul european. Fiiolele sunt de 1 ml, indiferent de concentrație, extractul apos fiind un lichid limpede, transparent, transparent pentru concentrațiile reduse și progresiv mai gălbui odată cu creșterea concentrației. În studiu s-a utilizat Isorel A 60 mg/ml (fiola de 1 ml soluție injectabilă care conține 991,54 mg extract apos din 60 mg plante proaspete de *Viscum album* (planta totă) în soluție izotonică de clorură de sodiu).

Studiul 1. Efectul extractului total de *Viscum album* asupra parametrilor hematologici și imunologici ai pacienților non-neoplazici

Acesta este un studiu prospectiv de cohortă menit a evalua efectele hematologice imunologice și biologice ale administrării unui extract total de *Viscum album* unui lot de pacienți întâlnit în mod uzual în secțiile de medicină internă.

Au fost recrutați toți pacienții internați în Secția Medicină Internă a Spitalului Clinic C.F. Cluj în perioada 01-31 august 1998. Au fost excluși pacienții cunoscuți cu afecțiuni care alterează răspunsul imun: cancer, inflamații acute, stări septice - 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).

Administrarea a constat din 1 fiolă ISOREL A (60mg/ml), dizolvată în 250 ml ser fiziologic și administrată în perfuzie iv. în decurs de 1 oră, de trei ori în decursul unei săptămâni (zilele 1,3,5), timp de 2 săptămâni.

Un număr de 30 de pacienți au corespuns criteriilor de includere (Tabel I.). Majoritatea pacienților aveau asociate 3 sau mai multe boli.

Tabel I. Principalele boli sistematizate pe grupuri de afecțiuni

Afecțiuni cardio-vasculare	Afecțiuni endocrine
HTA (n=7)	Hipotiroidism (n=1)
Cardiopatie ischemică (n=7)	Gușa nodulară (n=1)
Insuficiență venoasă cronică (n=1)	
Afecțiuni metabolice	Afecțiuni urologice
Obezitate (n=4)	Litiază urinară (n=3)
Dislipidemie (n=4)	Adenom de prostată (n=1)
DZ (diabet zaharat) (n=2)	
Alte afecțiuni	Afecțiuni digestive
Nevroză (n=1)	Boală de reflux gastro-esofagian (n=2)
Spasmofilie (n=2)	Ulcer gastro-duodenal (n=3)
Migrenă (n=2)	Steatofibroza hepatică (n=2)
Spondiloză (n=2)	Pancreatită cronică (n=3)
	Diskinezie biliară (n=3)
	Colecistită cronică (n=1)

Principalele efecte biologice și clinice constatate pot fi sumarizate astfel:

- Leucocitele au crescut cu 10% (neseemnificativ statistic)
- Limfocitele au crescut cu 17% (p=0,02)
- Imunoglobulinele au înregistrat variații neseemnificative (p 0,38-0,92)
- Hemoglobina - creștere neseemnificativă de 3% (p=0,15).
- Proteinele totale și fracțiunile electroforetice: albumine, alfa 1, alfa 2, beta și gama-globuline, nu s-a modificat după tratament (PT p=0.7 și “p” cu valori de la 0.051 la 0.73 pentru fracțiunile electroforetice)

- VSH – fără modificări semnificative
- Proteina „C” reactivă, negativă inițial la toate cazurile conform criteriilor de includere, a rămas în continuare negativă, cu valori <5 mg/L la toate cazurile.
- Pacienții normoglicemici nu au înregistrat glicemii patologice
- Pacienții diabetici (tip II sub tratament ADO) au avut variații ale glicemiei în limita de ± 12 mg/dl față de valorile inițiale.
- La pacienții normotensivi valorile TA au variat în medie cu ± 5 mmHg pentru cea sistolică și ± 7 mmHg, rămânând în limite normale.
- La pacienții hipertensivi, toți aflați sub tratament cu diferite clase de antihipertensive, fluctuațiile mediei TA sistolice au fost de ± 11 mmHg și a TA diastolice ± 9 mmHg.

În concluzie, s-a constatat că protocolul nostru actual de administrare a extractului de vâsc ISOREL se caracterizează prin lipsa efectelor adverse ceea ce va permite în continuare administrarea fără întreruperi a tratamentului și continuarea următoarelor studii cu doze relativ mari.

Studiul 2. Reacția imunologică a pacienților cu cancer colorectal tratați cu extractul total de *Viscum album*

Studiul urmărește să stabilească dacă beneficiile de supraviețuire a pacienților cu cancer colorectal obținute prin terapia cu extract de *Viscum album* au la bază o modificare a unora dintre acești factori prognostici. Dintre aceștia, literatura de specialitate recentă îi acordă o deosebită importanță infiltratului inflamator (limfocitar) intratumoral (tumor infiltrating lymphocytes -TIL's). În mod uzual, numărul și citotoxicitatea TIL sunt scăzute, însă în urma stimulării prin citokine (de ex. IL-2) sau alte mecanisme imunologice, numărul acestora crește iar citotoxicitatea lor o poate depăși de 50-100 de ori pe cea a LAK (lymphokine activated killer cells). De aceea, analiza TIL în condițiile terapiei cu *Viscum album* este în măsură să identifice dacă activarea TIL este unul din mecanismele de acțiune ale extractelor de vâsc.

Deși nu atât de important ca și TIL, și infiltratul inflamator peri-tumoral (cu limfocite și alte celule inflamatorii) joacă cu siguranță un anumit rol în interacțiunea dintre tumoră și organism. Comportamentul acestuia sub tratamentul cu extracte de vâsc merită de asemenea explorat.

TNF α (Tumor necrosis factor alpha) este o citokină proinflamatoare cu rol important în micromediul tumoral, cu implicații atât în controlul căilor apoptozei cât și a răspunsului imun mediat prin limfocitele T. Rolul TNF α ca și factor de prognostic este însă neclar în condițiile în care alături de majoritatea studiilor care îl consideră factor prognostic favorabil există o serie de alte studii valide care corelează TNF α cu un

prognostic nefavorabil. Acesta este motivul pentru care evaluarea influenței extractelor de *Viscum album* asupra expresiei $TNF\alpha$ este o altă prioritate a studiului.

Au fost considerate ca „pozitive” pentru prezența infiltratului inflamator peritumoral cazurile la care s-a evidențiat prezența de pseudo-foliculi limfoizi (“Crohn-like”)(Fig.1) sau a infiltrării cu leucocite polimorfonucleare ,PMN (cu sau fără formare de microabcese)(Fig. 2 a,b,c)

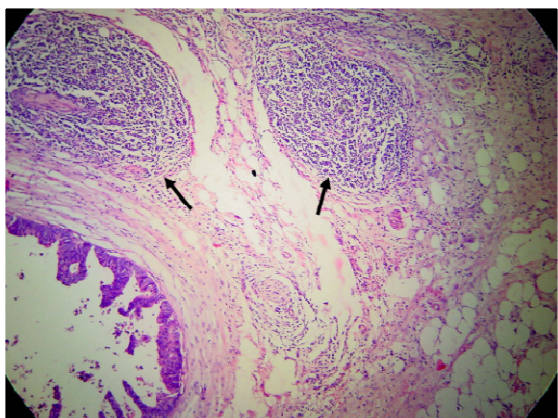


Fig. 1. Infiltrat limfoidal folicular „Crohn-like”

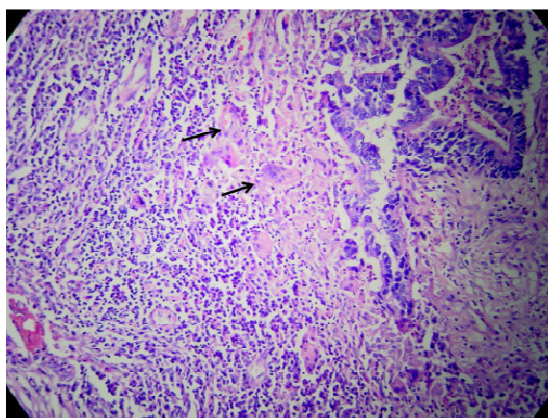


Fig. 2a. Infiltrat cu PMN și celule gigante multinucleate

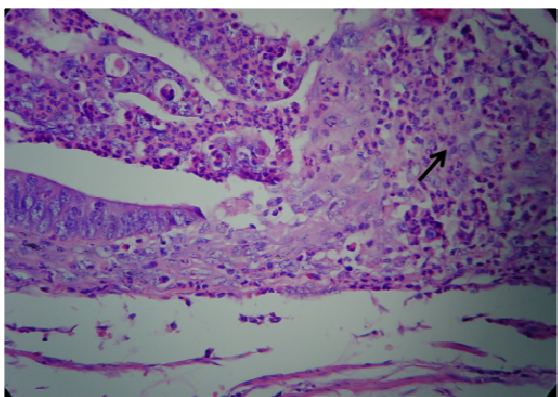


Fig. 2b. Infiltrat cu PMN cu formare de microabcese

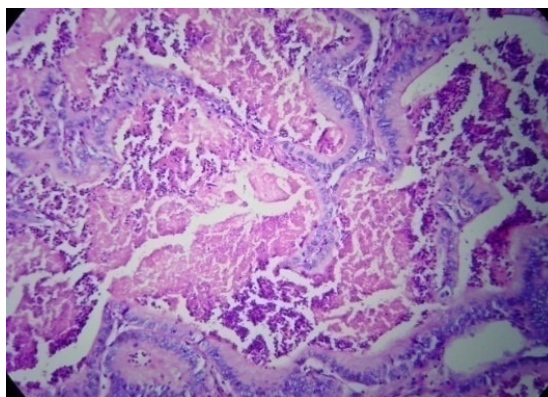


Fig. 2c. Infiltrat cu PMN cu necroză tumorală

TIL au fost numărate pe aceleași secțiuni și au fost exprimate ca număr de celule mononucleare din interiorul epiteliului glandular tumoral (și nu în stromă !) raportat la 1000 de celule epiteliale (Fig.3a,b)

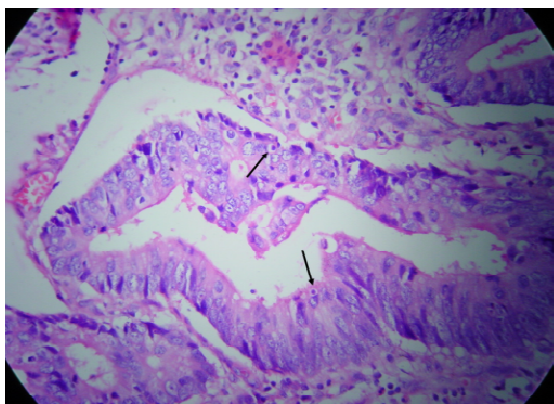


Figura 3a. TIL (mărire x 400)

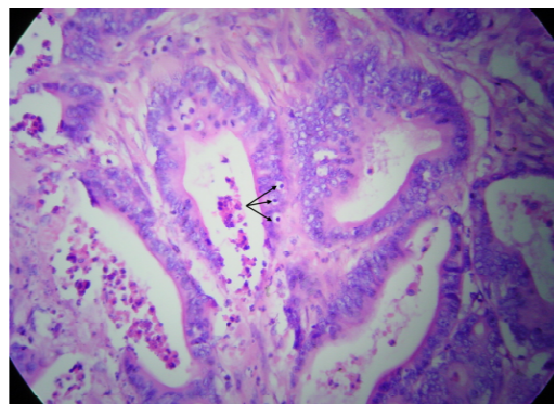


Fig. 3b. TIL (mărire x 400)

Determinarea TNF- α s-a făcut de două ori: cu 10 zile înaintea intervenției chirurgicale (înainte de inițierea pregătirii preoperatorii și a imunoterapiei) și în ziua a 10-a postoperator; la grupul „Isorel” s-a mai făcut această determinare suplimentar în ziua intervenției chirurgicale, înainte de inducerea anesteziei (Fig.4).

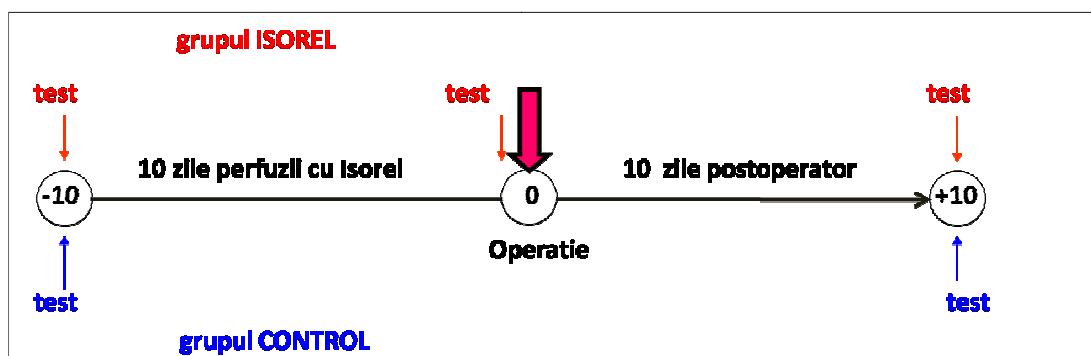


Fig. 4. Design-ul studiului de determinare a alfa TNF

Răspunsul inflamator peritumoral

S-a constatat un răspuns inflamator peritumoral pozitiv la 14 din cei 20 de pacienți (70%) ai grupului Isorel comparativ cu 10 din cei 20 de pacienți ai grupului de control. Diferența nu este semnificativă statistic între cele două grupuri ($p=0.1$), și nici dacă se analizează stratificat pentru cele 4 stadii Dukes (Tabelul II.).

Tabel II. Proporția pacienților care au dezvoltat un răspuns inflamator peritumoral pozitiv

	Isorel		Control		p
All stages	14/20	70%	10/20	50%	ns
stage A	-	-	-	-	-
stage B	7/10	70%	6/10	60%	ns
stage C	6/7	86%	4/8	50%	ns
stage D	1/3	33%	0/2	0%	ns

Evaluarea TIL

Valoarea medie a TIL în grupul Isorel a fost de $30,5 \pm 18,03/1000$ celule epiteliale, în timp ce în grupul de control a fost $26,6 \pm 13,65/1000$ celule epiteliale. Din punct de vedere statistic valoarea ($p=0.06$, student t-test) are semnificație de tendință, apropiindu-se de limita semnificației statistice.

TNF- α circulant

Determinarea nivelelor circulante ale TNF- α s-a realizat la 8 pacienți din grupul Isorel și la 12 pacienți din grupul de control. În grupul Isorel, nivelul inițial (ziua -10) al TNF- α a avut o valoare medie de $24,43 \pm 5,39 \mu\text{m/ml}$, similară cu cea a grupului de control ($18,63 \pm 9,96 \mu\text{m/ml}$, $p=0.07$). Consecutiv imunoterapiei, nivelul acestuia a crescut semnificativ până la $38,88 \pm 22,89 \mu\text{m/ml}$ ($p=0.05$) în ziua operației (0), pentru ca postoperator, deși înregistrând o ușoară scădere ($p=0.1$) la $33,69 \pm 24,03 \mu\text{m/ml}$ în ziua +10, să rămână totuși semnificativ crescut față de valoarea grupului de control în ziua +10: $15,77 \pm 7,15 \mu\text{m/ml}$, $p=0.01$) (Fig. 5).

Studiul 3. Efectul extractului total de Viscum album asupra supraviețuirii pacienților cu cancer colorectal

Studiul își propune să evalueze supraviețuirea pacienților operați pentru cancer colorectal avansat, metastatic sau nu, în condițiile asocierii extractului de Viscum album complementar la chimioterapia modernă, printr-un studiu prospectiv de tipul trialului randomizat controlat.

Pacienți - toți pacienții care s-au adresat Clinicii Chirurgie IV a UMF Cluj cu carcinoame colorectale confirmate histologic în perioada octombrie 1997 - octombrie 2005, care au respectat criteriile de includere (adenocarcinoame rezecabile, vârsta <85 ani, fără alte neoplazii în antecedente etc.) (309 cazuri)

Randomizarea: plicuri sigilate, blocuri de câte 4

Tratament chirurgical: rezecții

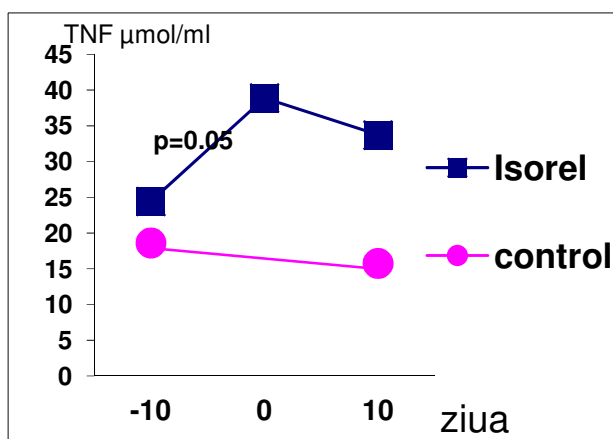


Fig. 5. Variația nivelelor serice de TNF- α în perioada perioperatorie

curative colorectale, rezecția metastazelor hepatice unice când întreaga intervenție chirurgicală avea viză curativă

Chimioterapie: FU FOL (5-fluorouracil -5FU + acid folinic) ca monoterapie, precum și combinațiile FOLFIRI (leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecan) și FOLFOX (leucovorin, 5-fluorouracil, oxaliplatin)

Imunoterapia: ISOREL câte 2 fiole (120 mg), în fiecare din zilele 1,3 și 5 ale săptămânii, începând din perioada imediat postoperatorie și continuând neîntrerupt in medie până la 2 ani postoperator (între 1 și 5 ani). Administrarea a fost făcută intravenos, în perfuzie, în cursul spitalizării, iar după externare pacienții au continuat terapia prin injectare subcutanată, în aceleași doze.

Parametrii analizați: supraviețuirea globală (curbe de supraviețuire Kaplan Meier comparate prin testul Log-Rank sau Cox's F), complicațiile postoperatorii, efectele adverse ale administrării imunoterapiei

Rezultate

Numărul de cazuri disponibil pentru analiza supraviețuirii a fost de 124 (Tabel III)

Tabel III: Stratificarea grupurilor de tratament în funcție de stadiul tumoral Dukes și tipul de chimioterapie

	Stadiul Dukes C		Stadiul Dukes D	
	Imunoterapie n = 41	Control n = 48	Imunoterapie n = 17	Control n = 18
Regim chimioterapie	35 (85%)	38 (79%)	15 (88%)	16 (88%)
FU FOL	19	20	8	8
FOLFIRI sau FOLFOX	16	18	7	8
Fără chimioterapie	6	10	2	2

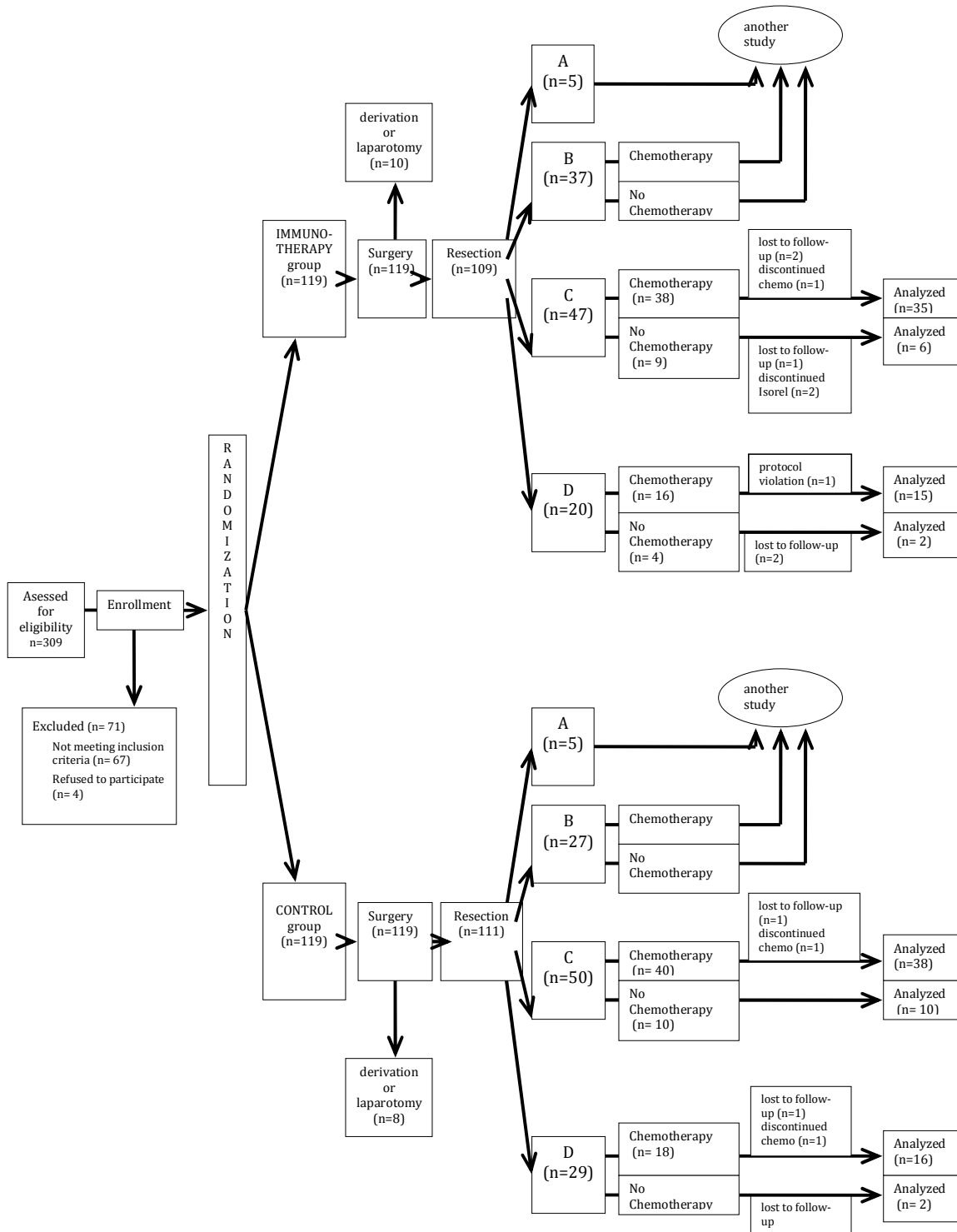


Fig 6. Diagrama CONSORT a studiului

Supraviețuirea globală specifică de cancer pentru pacienții cu stadii avansate (stadiile C+D împreună) a fost semnificativ mai mare pentru grupul Imunoterapie comparativ cu grupul Control: ratele de supraviețuire la 5 ani: 39,7% vs. 15,4%, supraviețuirea medie 41 vs.27 luni, cu o mediană a supraviețuirii de 34,5 vs. 24 luni și cu o diferență semnificativă între curbele estimate de supraviețuire Kaplan – Meier comparate prin testul Log-Rank ($p < 0.0001$) (Fig. 7)

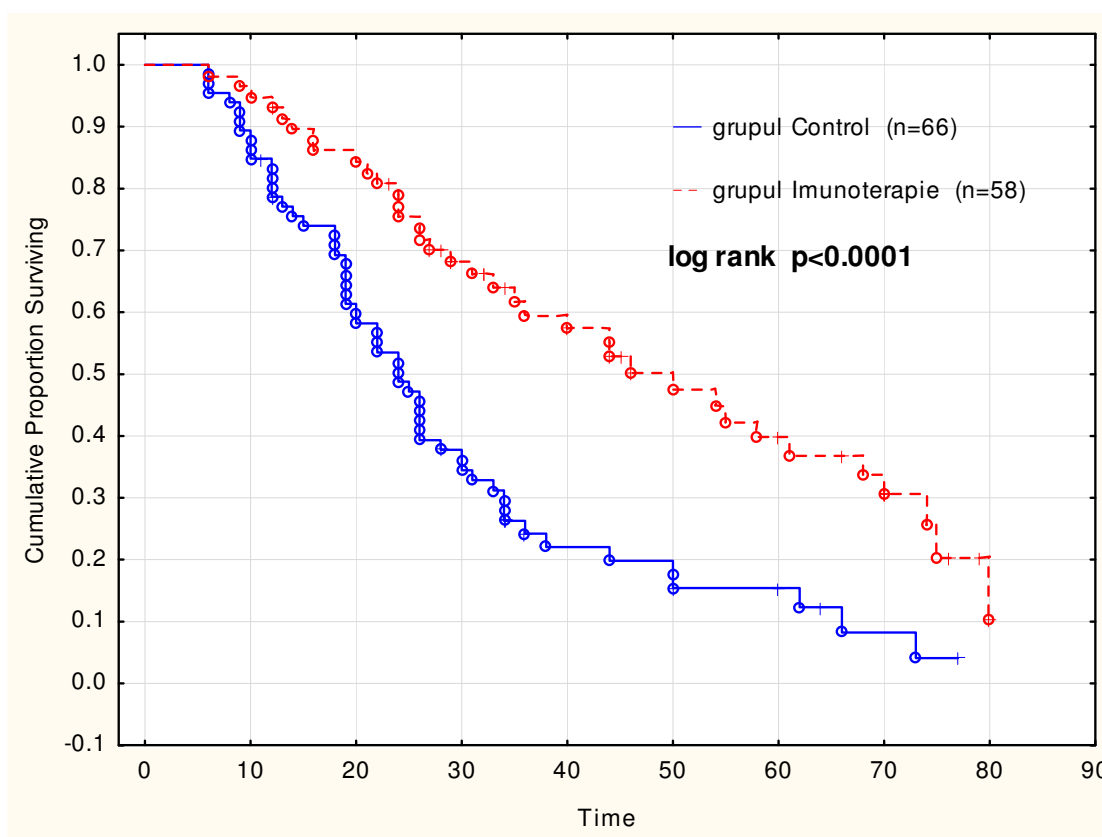


Fig. 7: Evaluarea globală a supraviețuirii pentru stadiile C+D în funcție de imunoterapie

Analizate separat pentru fiecare stadiu în parte, C și respectiv D, diferențele de supraviețuire dintre grupurile de tratament Imunoterapie și Control se mențin înalt semnificative: Log-Rank $p < 0.0001$ pentru stadiul C (Fig. 8) și $p = 0.008$ pentru stadiul D (Fig. 9).

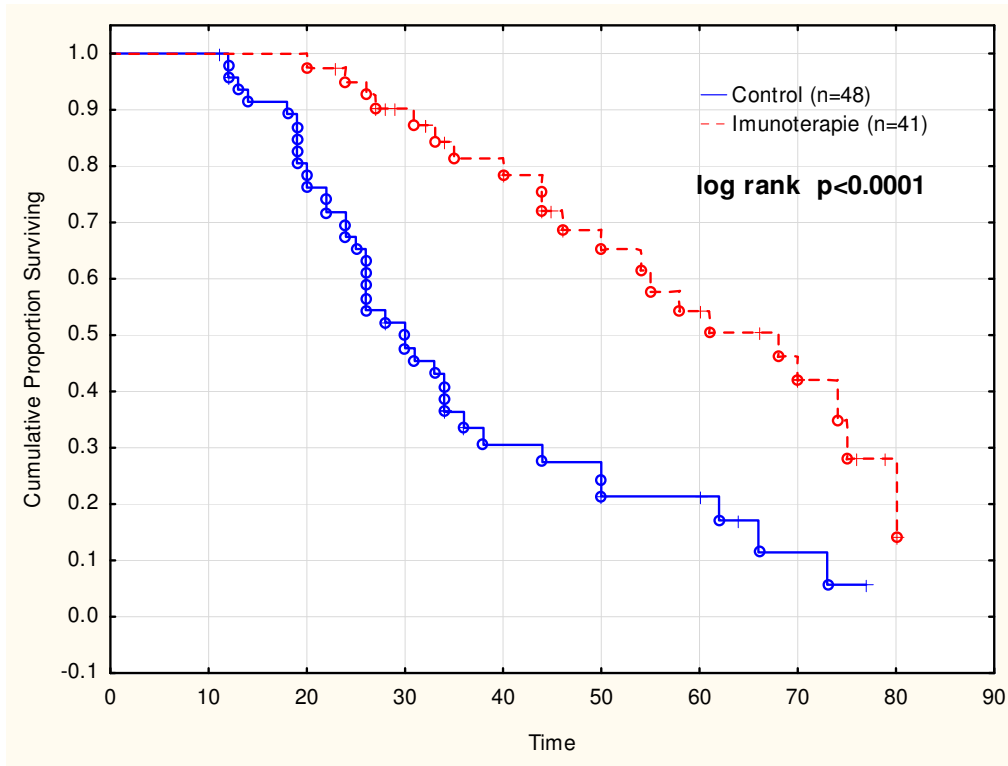


Fig. 8: Evaluarea supraviețuirii pentru stadiul C în funcție de imunoterapie

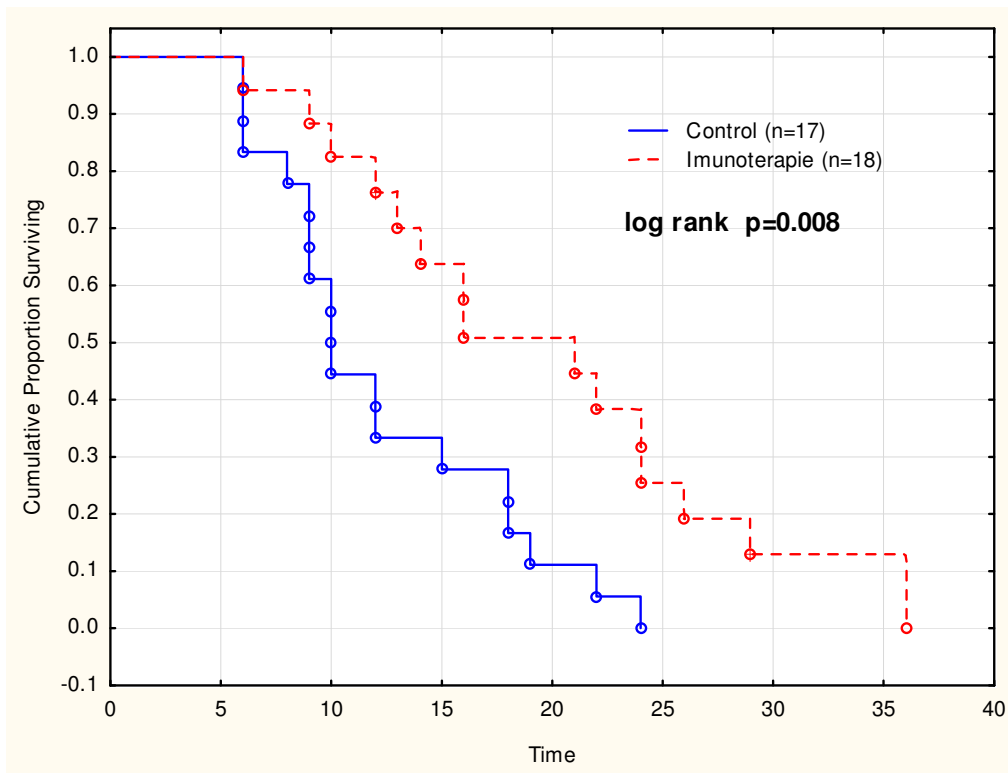


Fig. 9: Evaluarea supraviețuirii pentru stadiul D în funcție de imunoterapie

Analiza supraviețuirii stratificată în funcție de tipul de chimioterapie, pentru fiecare stadiu tumoral Dukes, C și respectiv D, arată (Tabel IV.):

- pentru stadiul C (Fig. 10): cea mai mare supraviețuire o oferă Imunoterapia în combinație cu chimioterapia de tip FOLFOX sau FOLFIRI (mediana supraviețuirii mS= 57,5 luni și supraviețuirea la 5 ani 64%.
- pentru stadiul D (Fig. 11): cea mai mare supraviețuire o oferă de asemenea Imunoterapia în combinație cu chimioterapia de tip FOLFOX sau FOLFIRI

Tabel IV: Mediana supraviețuirii (mS) și rata supraviețuirii la 5 ani (S₅) sau supraviețuirea maximă (S_{max}) pentru grupurile de tratament Imunoterapie și Control, stratificate pe stadii tumorale Dukes și tipul de chimioterapie

	Stadiul Dukes C		Stadiul Dukes D	
	Imunoterapie mS = 46 S ₅ = 42%	Control mS = 29 S ₅ = 17%	Imunoterapie mS = 16 luni S _{max} = 36 luni	Control mS = 10 luni S _{max} = 24 luni
Regim chimioterapie				
FU FOL	mS = 46 luni S ₅ = 46,2%	mS = 24 luni S ₅ = 17,4%	mS = 13,5 luni S _{max} = 26 luni	mS = 9,5 luni S _{max} = 12 luni
FOLFIRI sau FOLFOX	mS = 57,5 luni S ₅ = 64,2%	mS = 34 luni S ₅ = 38,2%	mS = 24 luni S _{max} = 36 luni	mS = 18 luni S _{max} = 24 luni
Fără chimioterapie	mS = 27,5 luni S _{max} = 46 luni	mS = 29,5 luni S _{max} = 34 luni	mS = 18 luni S _{max} = 24 luni	mS = 7,5 luni S _{max} = 9 luni

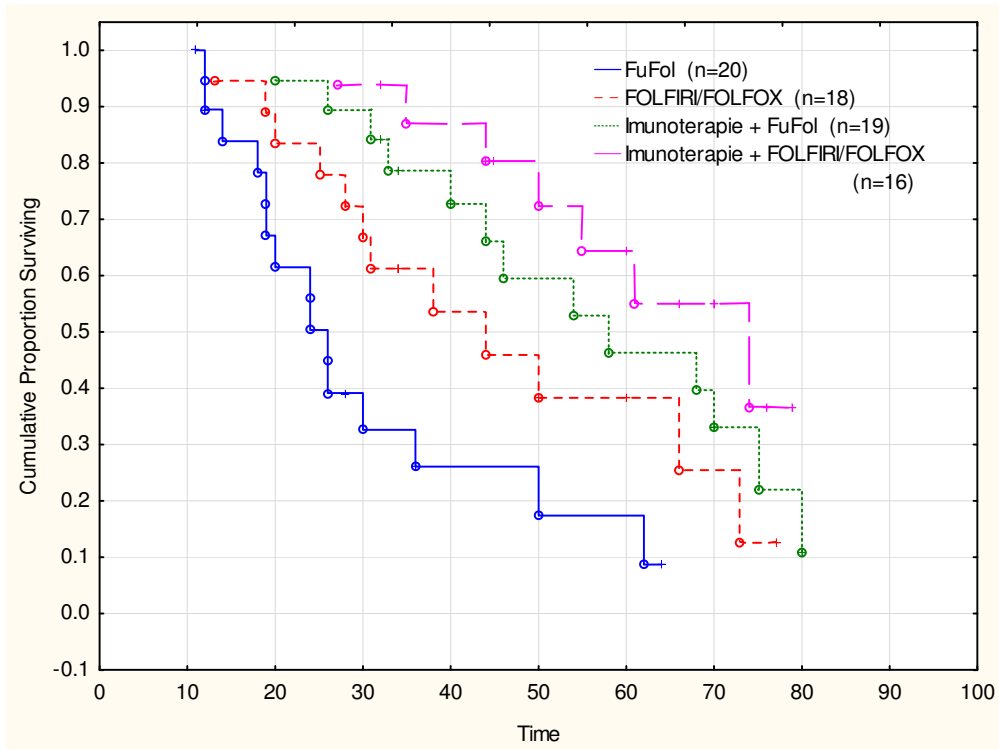


Fig. 10. Evaluarea supraviețuirii pentru stadiul C în funcție de imunoterapie și tipul de chimioterapie

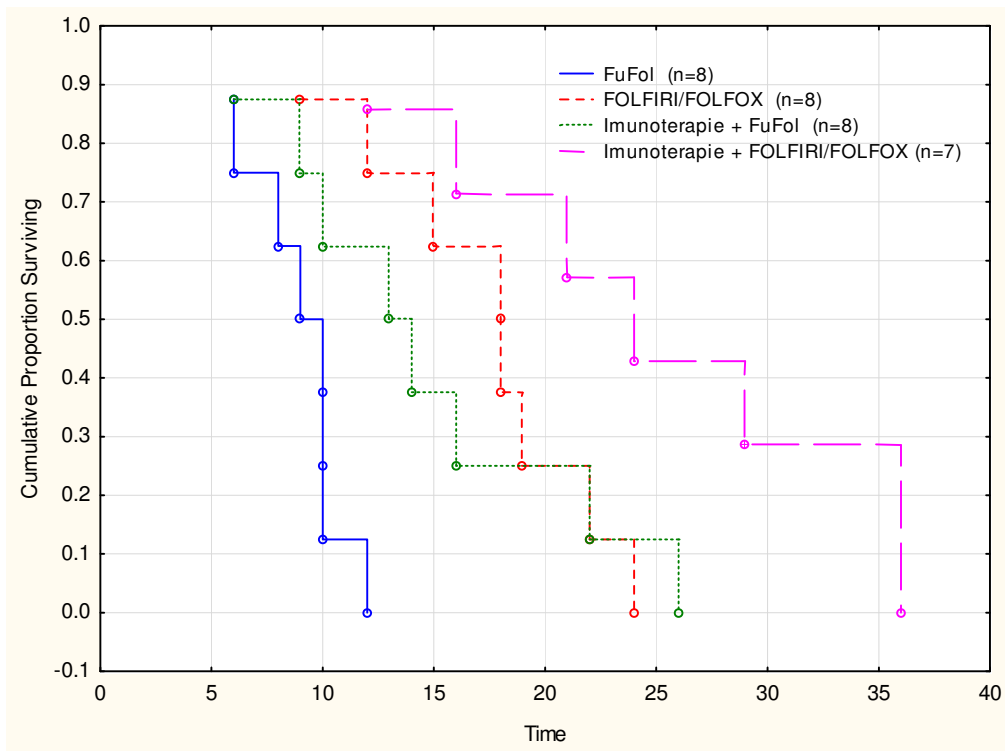


Fig. 11. Evaluarea supraviețuirii pentru stadiul C în funcție de imunoterapie și tipul de chimioterapie

În cadrul studiului au mai fost evidențiate diferențele importante de supraviețuire între sub-stadiile A,B și C din interiorul stadiului tumoral TNM III (Dukes C), aspect ce are o mare importanță pentru acest studiu întrucât proporția neobișnuit de mare a substadiului III C, de peste 50% din totalul cazurilor stadiului III (Fig. 12 a,b), și care are un prognostic mai apropiat de cel al stadiului IV, explică de ce supraviețuirile acestui stadiu sunt mai reduse decât cele citate în literatură.

Din punctul de vedere al efectelor imunoterapiei, se constată și de această dată supraviețuiri semnificativ mai mari la cazurile imunotratate față de cazurile de control, pentru fiecare din sub-stadiile A, B și C, dar îndeosebi pentru B și C. (Fig. 13,14,15)



Fig. 12 a. Stadiul Dukes C respectiv III TNM - Grupul „Imunoterapie”

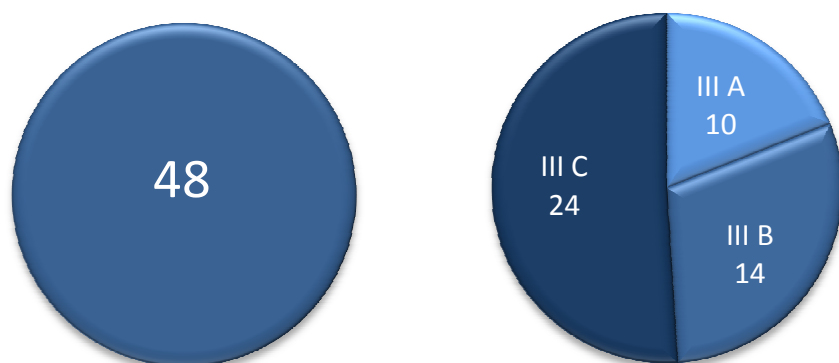


Fig. 12 b. Stadiul Dukes C respectiv III TNM - Grupul „Control”

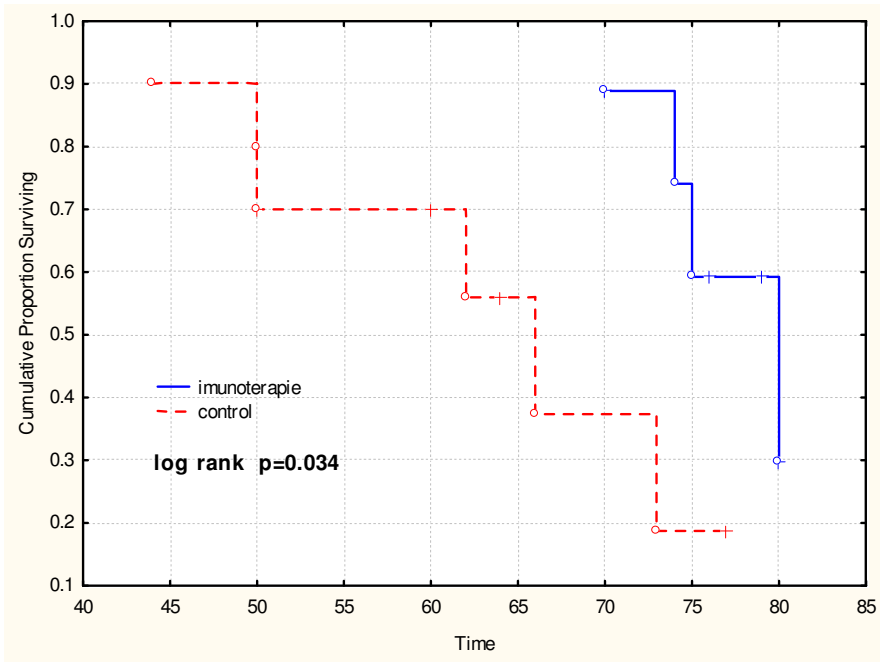


Fig. 13 Supraviețuirile sub-stadiului III A în funcție de imunoterapie

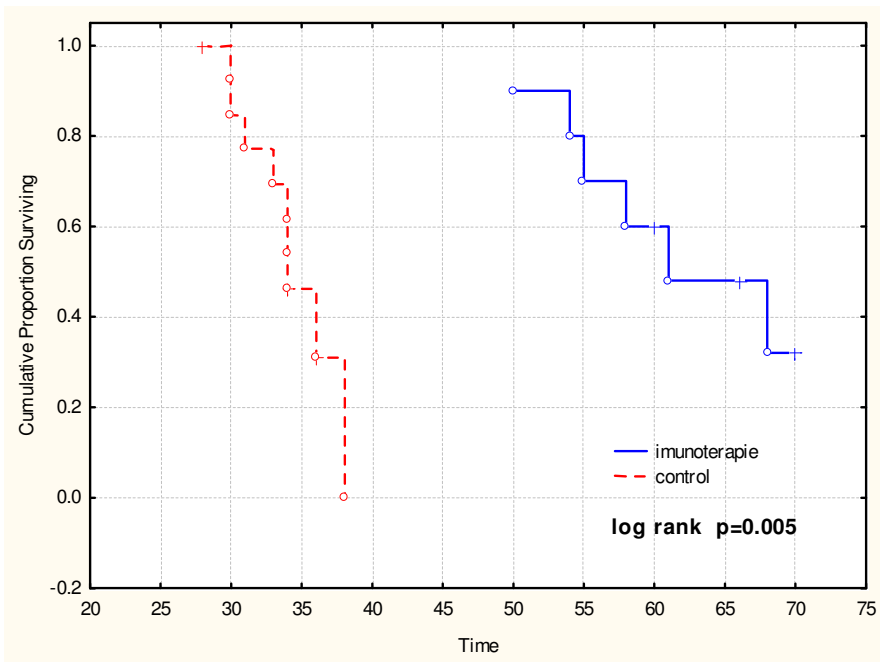


Fig. 14 Supraviețuirile sub-stadiului III B în funcție de imunoterapie

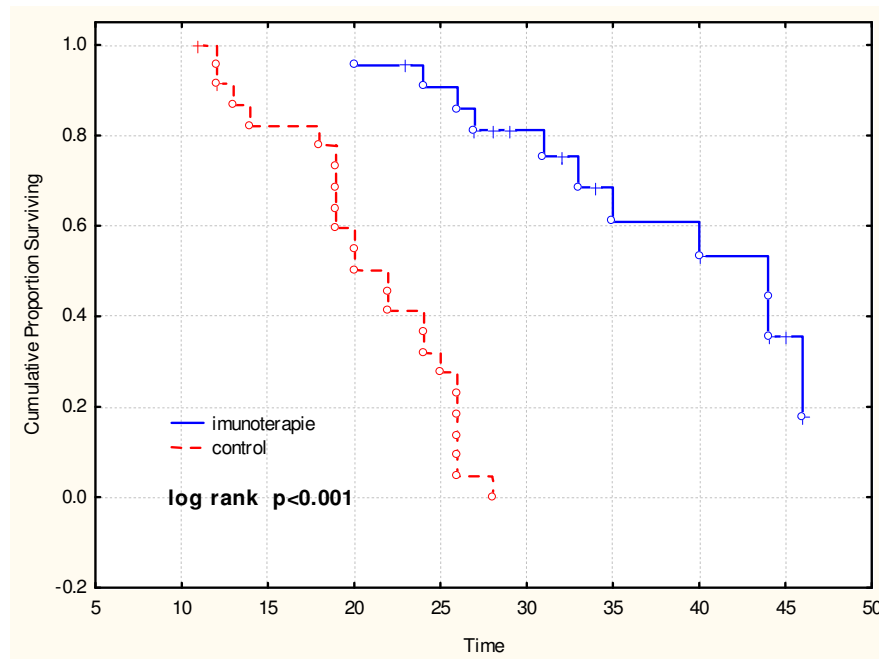


Fig. 15 Supraviețuirile sub-stadiului III C în funcție de imunoterapie

2. Concluzii generale

- Protocolul nostru de administrare intravenoasă a unor doze terapeutice (60-120 mg/doză) din extractul de *Viscum album L.* -Isorel nu modifică semnificativ constantele biochimice, hematologice, inflamatorii sau imunologice ale pacienților și nu are efecte adverse cardio-vasculare sau alergice-anafilactice.
- Administrarea extractului de *Viscum album L.* -Isorel produce un răspuns inflamator intratumoral, obiectivat printr-o tendință de creștere a numărului TIL aflată la limita semnificației statistice, dar fără o creștere semnificativă a răspunsului inflamator peritumoral.
- Administrarea preoperatorie timp de 10 zile a extractului de *Viscum album L.* -Isorel produce o creștere semnificativă a nivelurilor serice ale TNF- α , creștere care se menține în perioada postoperatorie cel puțin 10 zile dar care nu se însoțește de creșterea a ratei complicațiilor.
- Administrarea postoperatorie sistematică a extractului de *Viscum album L.* -Isorel pe o perioadă medie de 2 ani realizează la pacienții cu CCR avansat o creștere a ratelor de supraviețuire globală la 5 ani de la 15,4% la 39,7%, a

supraviețuirii medii de la 27 la 41 de luni, a medianei supraviețuirii de la 24 la 34,5 luni și o ameliorare semnificativă a curbelor estimate de supraviețuire Kaplan – Meier (Log-Rank $p < 0.0001$), față de pacienții care nu au efectuat această imunoterapie.

- Pentru stadiul tumoral Dukes C cea mai mare supraviețuire o oferă imunoterapia în combinație cu chimioterapia de tip FOLFOX sau FOLFIRI, realizând o mediană a supraviețuirii $mS = 57,5$ luni și o supraviețuire globală la 5 ani de 64%.
- Pentru stadiul D cea mai mare supraviețuire o oferă de asemenea imunoterapia în combinație cu chimioterapia de tip FOLFOX sau FOLFIRI (mediana supraviețuirii $mS = 24$ luni, supraviețuirea la 2 ani 43% și supraviețuire maximă de 36 luni). Pentru acest tip de tratament, beneficiul adus de imunoterapie se traduce printr-o creștere a medianei supraviețuirii cu 6 luni.

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

The Multimodal Treatment of Colorectal Cancer. Immunotherapy as Part of the Therapeutic Protocol

PhD candidate: **Traian-Dorin, Oniu**

PhD coordinator: **Mircea, Cazacu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
I. Molecular basis of <i>Viscum album</i> extract immunomodulation	19
1.1. Mistletoe botanics – “Nothing is normal”	19
1.2. Mistletoe medicinal products	20
1.3. Mistletoe extract components with antitumoral effect	20
1.4. Mistletoe extracts action mechanisms	30
II. Mistletoe extract therapy through evidence-based medicine – Clinical studies on mistletoe extract immunomodulation In colorectal cancer	31
2.1. Introduction	31
2.2. Prospective comparative studies	32
2.3. Retrospective comparative studies	38
2.4. Group studies and case series	45
2.5. Systematic study reviews on mistletoe extract	47
2.6. Conclusions	47
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis	51
2. General methodology	53
3. Study 1 – The effect of <i>Viscum album</i> total extract on the hematological and immunological parameters of non- neoplastic patients	57
3.1. Work hypothesis	57
3.2. Material and method	58
3.3. Results	59
3.4. Discussions	63
4. Study 2 – The immunological reaction of colorectal cancer patients treated with <i>Viscum album</i> total extract	67
4.1. Work hypothesis	67
4.2. Material and method	68
4.3. Results	73

4.4. Discussions	76
5. Study 3 – The effect of <i>Viscum album</i> total extract on colorectal cancer patients' survival rate	79
5.1. Work hypothesis	79
5.2. Method	79
5.3. Results	86
5.4. Discussions	109
6. General conclusions	113
REFERENCES	117

KEY WORDS

Colorectal cancer, immunotherapy, *Viscum album*, mistletoe extracts, mistletoe lectins, mistletoe toxins, ISOREL, surgical treatment, chemotherapy, survival, randomized clinical trial, TIL- tumor infiltrating lymphocytes, intratumoral inflammatory infiltrate, peritumoral inflammatory infiltrate, TNF α -Tumor necrosis factor alpha

INTRODUCTION

This present thesis aims to obtain answers in the crossover field that is *Viscum album* extract immunotherapy.

Viscum album extracts began being tested as antineoplastic medication after 1920, as proposed by Rudolf Steiner, founder of the anthroposophy philosophy, it being an important therapeutic element of anthroposophic medicine. The results of these early trials were never presented in a scientific medical manner, as they were considered to be mere "case-reports" at best.

Although pre-clinical studies have progressively deciphered, these past decades, both the active biological substance content of mistletoe extracts, as well as a multitude of antineoplastic immunological mechanisms, clinical studies on oncologic effects dated before the 90s are irrelevant due to a lack of proper medical scientific research methodology and present little interest due to either chemotherapy not being

used or too old chemotherapy protocols being used in association with mistletoe extracts in those times.

During the past 2 decades, although medical scientific research methods have been better defined by offering modern study instruments, the interest in mistletoe extract immunotherapy decreased, as the oncologic medical community turned its attention to new chemotherapeutic and biological response altering agents. Thus, no such studies were carried out to match the possibilities, the mistletoe only sporadically sparking the interest of immunologists, biologists and researchers working in complementary and alternative medicine. Moreover, most studies were carried out just to cater to the concerns of companies making mistletoe extract products.

Under the circumstances, assessing such a particular type of immunological therapy within a concrete field of oncologic pathology, such as colorectal cancer, cannot be based much on obsolete preclinical data and clinical studies. It practically needs to go through the entire process again, starting with feasibility and immunological studies and culminating with survival rate and life quality studies. Therefore, by means of this present thesis, we aim to carry out several studies, of gradually increasing complexity, in order to successively analyze the aforementioned aspects:

- VI. In chapter 1 of the first part we identified in literature the current knowledge on all chemical components of mistletoe extracts, on all immunological and biological mechanisms which they exert in vitro or in vivo, according to a multitude of preclinical studies.
- VII. Chapter 2 of the first part is an exhaustive review of all known clinical studies on colorectal cancer treatment with different mistletoe extracts, their conclusions being assessed through evidence-based medicine.
- VIII. Study 1 is a feasibility study which aims to reveal the eventual negative effects or, on the contrary, to prove the safe use of Isorel mistletoe extract, for the clinical studies that followed. We preliminarily assessed the extract's global effect on the immune and biological state of a cohort of non-neoplastic patients, which presented a series of other morbidities covering the entire internal medicine spectrum and being usually found as co-morbidities in colorectal cancer patients.
- IX. Study 2 explores the local, intra- and peritumoral inflammatory alterations which appear after *Viscum album* extract therapy, as well as the TNF serum level perioperative dynamics during this immunotherapy. These aspects are known to be colorectal cancer prognosis factors, for which reason the study aims to establish whether colorectal cancer patients survival benefits obtained

through *Viscum album* extract therapy are based on the alteration of some of these prognosis factors.

V. Study 3 assesses, by means of a randomized clinical trial, whether mistletoe extract immunotherapy, when administered in addition to the colorectal cancer surgical and oncologic modern standard treatment, could influence the survival rate of these patients.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

I. Molecular basis of *Viscum album* extract immunomodulation

The mistletoe is quite literally an extraordinary plant. In fact one could say it is one of the most unusual, particular, special plants that grow in Europe. It does not depend on the annual solar cycle, as it bears fruit in winter, it ignores the soil features, as it depends solely on the host plant. In the same time, the mistletoe overlooks the host plant's own biological rhythms and does not drain its resources. And the list of mistletoe's special features could go on as we go deeper into its biological details.

Viscum album's main components are lectins, viscotoxins, oligo- and polysaccharides, alkaloids and lipid vesicles, but the component list includes over 100 more chemical substances: protein and glycoproteins, flavonoids, biogenic amines, choline derivatives, lignans, phenylpropane derivatives, phenol carboxylic acids, terpenes, phytosterols, free amino acids, DNA, RNA and many more.

A series of observations resulted from the study of mistletoe extracts, which emphasize the composition complexity, the diversity of action and interaction mechanisms between components: (1) a multitude of antitumoral active principles can be identified in mistletoe extracts; (2) each mistletoe substance has different antitumoral action mechanisms; (3) different substance classes appear to act in concert on a tumor/patient type; (4) mistletoe substances can alter each other's effects, could act in a synergic or antagonistic manner; (5) so far, the total extract effect hasn't been able to be reduced to the effect of a single substance; (6) the mistletoe extract preparation method can cause the formation of substance complexes and the alteration of singular biological features; it is quite possible that this process be one of the most relevant in obtaining antitumoral properties.

The main action mechanisms of mistletoe extracts are • stimulation of the immune system (increase of various T or NK lymphocytes subtypes) • stimulation of cytokines release, such as Interleukin 1, Interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) • direct cytotoxic effect on tumor cells • diminishing of conventional oncologic

therapies side effects (regeneration of hematopoietic marrow, leucocytes aso). • recovery of the lost weight due to the cachexia effect of tumors.

II. Mistletoe extract therapy through evidence-based medicine – Clinical studies on mistletoe extract immunomodulation in colorectal cancer

So far, 123 clinical studies on the therapeutic efficiency of mistletoe anthroposophic products in cancer patients are known. These were identified through data base search: AMED, Biosis Previews, Cinahl, Cochrane Library, Embase, Medline/Premedline, NLM Gateway, Science Citation Index, National Centre for Complementary and Alternative Medicine.

6 prospective comparative studies, of which 4 are randomized trials, 8 retrospective comparative studies and 2 cohort studies were identified in the field of colorectal cancer.

The 6 prospective comparative studies have the highest evidence level; they were carried out between the years 1986-2007 and compared a total of 190 patients treated with mistletoe extract versus 174 control patients. The results of these studies are the following:

- Survival rate improvement: 6 studies: Significant (3), trend (1), no quantified significance (1), soon (1)
- No study answered questions related to relapse rate and disease-free timeframe.
- Tumor remission: 2 studies: Significant but unclear on the methodology (1), no quantified significance (1)
- Life quality improvement: 3 studies: Significant (1), trend (1), no concrete data (1)
- conventional treatment side effect reduction: 2 studies: Significant (2) (NK after surgery and chemotherapy toxicity)
- Treatment tolerance was good, five studies (in which the medication was administered subcutaneous and in IV perfusion) mentioning the lack of local and systemic reactions.

The retrospective comparative studies were carried out between 1969-2007 on 1925 patients treated with mistletoe extracts.

Up to this present thesis, through evidence-based medicine, the most solid data on the mistletoe extract effects in the treatment of colorectal cancer refers to life quality improvement and increased tolerance for conventional therapies. These effects are obtained in perfectly safe conditions, as the treatment has absolute innocuity, with no or minimum side effects and zero risk. Moreover, many of the studies reported a survival benefit, but not without criticism. Certain tumor remissions were presented,

occasionally in detail, but in non-randomized studies and they seem to depend on the extract type, dosage and route of administration.

PERSONAL CONTRIBUTION

General methodology

Patients

The cases used in the various studies of this thesis were recruited from the patients of the IVth Medical and IVth Surgical Clinics of UMPH Cluj- Napoca, within the C.F. University Hospital Cluj-Napoca, from October 1997 until October 2005.

***Viscum album* total aqueous extract - ISOREL**

ISOREL, used in all studies of this thesis, is an original product of Novipharm G.m.b.H. - Austria and is an aqueous extract obtained through cold extraction from the entire *Viscum album* L. plant. - European mistletoe. It's available in 1 ml vials, regardless of concentration, the aqueous extract being a clear, transparent liquid, colorless in low concentrations and gradually yellower in higher concentrations. In this study we used Isorel A 60 mg/ml (1 ml injectable vial containing 991,54 mg of aqueous extract from 60 mg of fresh *Viscum album* plants - planta tota - in isotonic sodium chloride solution).

Study 1. The effect of *Viscum album* total extract on the hematological and immunological parameters of non-neoplastic patients

This is a cohort prospective study meant to assess the biological and immunological hematologic effects of *Viscum album* total extract administration to a group of patients usually met in Internal Medicine wards.

All patients admitted in the Cluj-Napoca CF Clinical Hospital Internal Medicine ward between August 1st and August 31st 1998, were recruited for the study. Patients known with immune response altering afflictions - cancer, acute inflammations, septic states (local or systemic infections), nephrotic syndrome, invasive medical procedures and recent surgical interventions - were excluded from the study. In order to exclude the presence of inflammations, only patients with normal ESR (< 25-50 mm/ 1-2 h) and C-reactive protein (CRP < 5 mg/L) levels were included in the study.

The administration consisted of one ISOREL A (60mg/ml) vial, dissolved in 250 ml physiological serum, through a 1 hour IV perfusion, three times a week (days 1, 3, 5), for 2 weeks.

30 patients matched the inclusion criteria (Table I.). Most patients had in addition 3 or more diseases.

Table I. Main diseases divided into affliction groups

<p>Cardio-vascular diseases</p> <p>HBP (n=7)</p> <p>Ischemic cardiomyopathy (n=7)</p> <p>Chronic venous disease (n=1)</p>	<p>Endocrine diseases</p> <p>Hypothyroidism (n=1)</p> <p>Nodular gout (n=1)</p>
<p>Metabolic diseases</p> <p>Obesity (n=4)</p> <p>Dyslipidemia (n=4)</p> <p>DM (diabetes mellitus) (n=2)</p>	<p>Urological diseases</p> <p>Urinary lithiasis (n=3)</p> <p>Prostate adenoma (n=1)</p>
<p>Other diseases</p> <p>Neurosis (n=1)</p> <p>Spasmophilia (n=2)</p> <p>Migrene (n=2)</p> <p>Spondilosis (n=2)</p>	<p>Digestive diseases</p> <p>Gastroesophageal reflux (n=2)</p> <p>Gastroduodenal ulcer (n=3)</p> <p>Hepatic steatofibrosis (n=2)</p> <p>Chronic pancreatitis (n=3)</p> <p>Gallbladder dyskinesia (n=3)</p> <p>Chronic cholecystitis (n=1)</p>

The main clinical and biological effects observed could be summarized as follows:

- 10% increase of leucocytes (statistically insignificant)
- 17% increase of lymphocytes (p=0,02)
- The immunoglobulins recorded insignificant variations (p 0,38-0,92)
- Hemoglobin – 3% insignificant increase (p=0,15).
- Total protein and electrophoretic fractionation: albumins, alpha 1, alpha 2, beta and gamma-globulins, did not alter after treatment (PT p=0.7 and “p” with values from 0.051 to 0.73 for electrophoretic fractionations)
- ESR – no significant alterations

- C-reactive protein, initially negative in all cases according to the inclusion criteria, remained negative, with values <5 mg/L in all cases.
- Normoglycemic patients did not show pathological glycemia
- Diabetic patients (type II DM treated with oral anti-diabetic medication) showed glycemia variations of ± 12 mg/dl in comparison with the initial values.
- BP levels in normotensive patients ranged on average by ± 5 mmHg the systolic one and ± 7 mmHg for the diastolic one, thus remaining within normal limits.
- In hypertensive patients, all being under treatment with various classes of antihypertensive drugs, the average fluctuations were of ± 11 mmHg for systolic BP and ± 9 mmHg for diastolic BP.

In conclusion, one observed that our current ISOREL mistletoe extract administration protocol is characterized by the lack of side effects, which will allow us to continue administering the treatment without interruptions and to continue the following studies with relatively high dosages.

Study 2. The immunological reaction of colorectal cancer patients treated with *Viscum album* total extract

The study aims to establish whether colorectal cancer patients survival benefits obtained through *Viscum album* extract therapy are based on the alteration of some of these prognosis factors. Out of these factors, specialized literature grants especially high importance to the tumor infiltrating lymphocytes (TIL's). Usually TIL number and cytotoxicity are low, but by cytokine stimulation (e.g. IL-2) or other immunological mechanisms, they number increases and their cytotoxicity can be 50-100 higher than that of LAK (lymphokine activated killer cells). Therefore, TIL analysis in *Viscum album* therapy is capable of showing whether TIL activation is one of the mistletoe extracts action mechanisms.

Although not as important as TIL, the peritumoral inflammatory infiltrate (with lymphocytes and other inflammatory cells) definitely has its own role to play in the interaction between tumor and body. Its behavior under mistletoe extract treatment also deserves to be explored.

TNF α (Tumor necrosis factor alpha) is a pro-inflammatory cytokine with an important role in the tumor microenvironment, with implications both in the apoptosis pathways control, as well as in the T-cell lymphocyte mediated immune response. The role of TNF α as prognosis factor is however unclear since, aside from most studies that consider it a favorable prognosis factor, there are also a few valid studies that associate TNF α with unfavorable prognosis. This would be the reason why the assessment of the

Viscum album extract influence on TNF α expression is yet another priority of this study.

The cases where there was obvious presence of lymphoid pseudo-follicles (Crohn-like) (Fig. 1) or polymorphonuclear leucocytes, PMN (with or without micro-abscesses) (fig. 2 a, b, c) were considered as “positive”, for the presence of peritumoral inflammatory infiltrate.

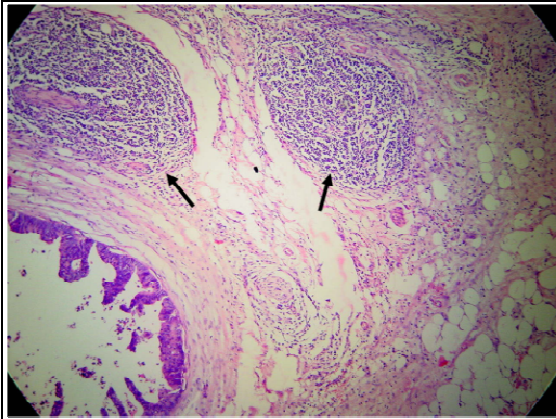
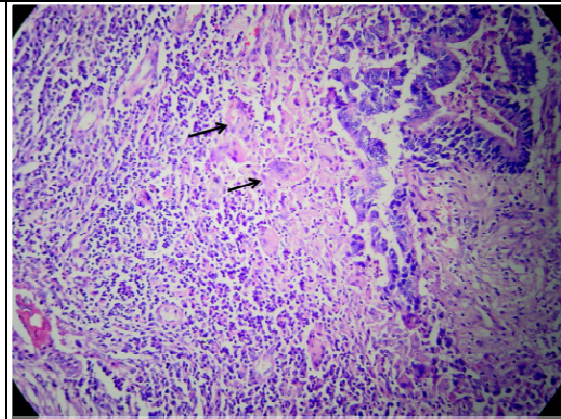
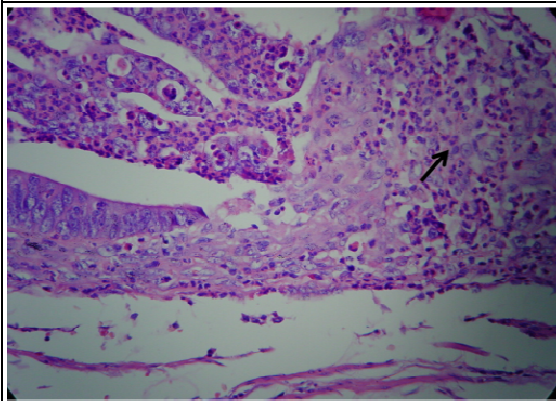


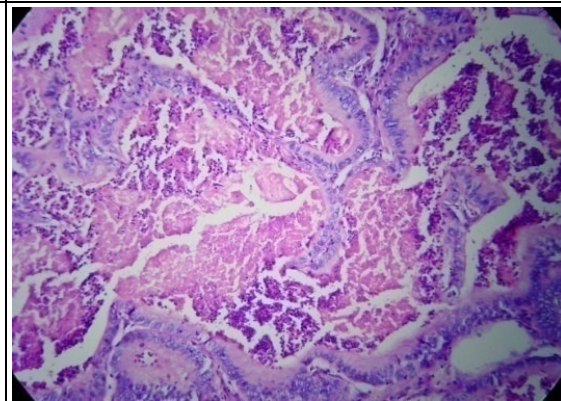
Fig. 1. „Crohn-like” follicular lymphoid infiltrate



2a. PMN and multinucleate giant cell infiltrate



2b. PMN with micro-abscess infiltrate



2c. PMN with tumor necrosis infiltrate

TIL were counted on the same sections and were stated as number of mononuclear cells in the glandular epithelium of the tumor (but not in the stroma!) to 1000 epithelial cells (Fig. 3 a, b)

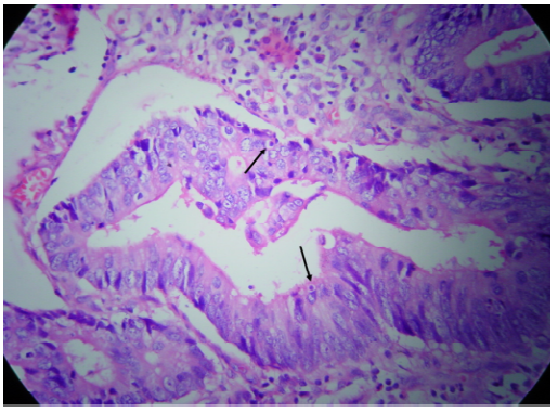
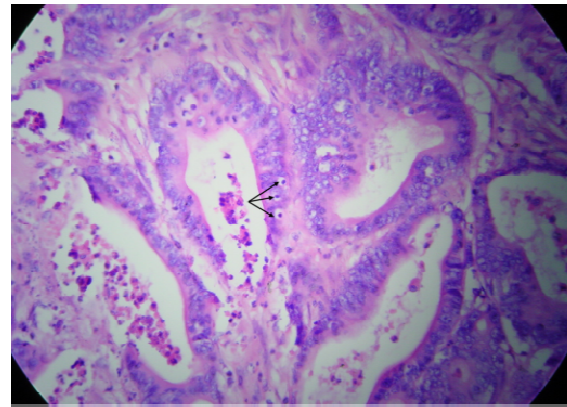


Fig 3a. TIL (zoom x 400)



3b. TIL (zoom x 400)

TNF- α determination was carried out twice: 10 days before surgery (before starting pre-operative preparation and immunotherapy) and 10 days after surgery; the “Isorel” group was also submitted to the test on the day of surgery, before anesthesia (Fig. 4).

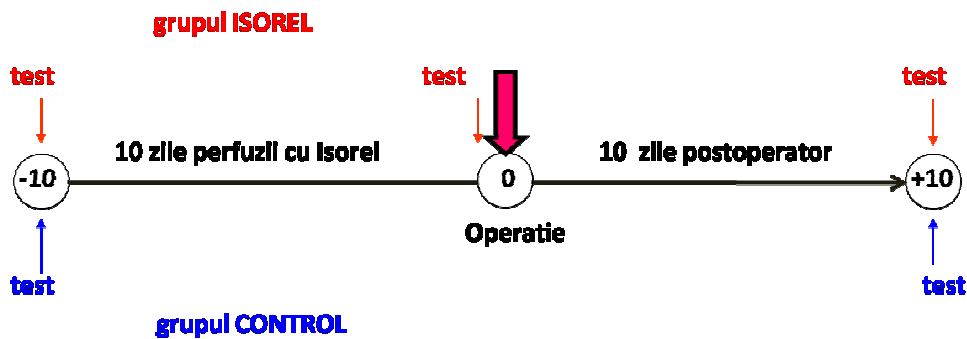


Fig. 4. Alpha TNF determination study design

Peritumoral inflammatory response

We recorded a positive peritumoral inflammatory response in 14 out of the 20 patients (70%) of the Isorel group, in comparison to 10 out of the 20 patients of the control group. The difference between the two groups is not statistically significant ($p=0.1$) even if it's assessed separately for the 4 Dukes stages (Table II.)

Table II. Ratio of patients who developed a positive peritumoral inflammatory response

	Isorel		Control		p
All stages	14/20	70%	10/20	50%	ns
stage A	-	-	-	-	-
stage B	7/10	70%	6/10	60%	ns
stage C	6/7	86%	4/8	50%	ns
stage D	1/3	33%	0/2	0%	ns

TIL evaluation

The average TIL value in the Isorel group was $30,5 \pm 18,03/1000$ epithelial cells, while in the control group it was $26,6 \pm 13,65/1000$ epithelial cells. Statistically this value ($p=0.06$, student t-test) has trend significance, approaching the limit of statistical significance.

Circulant TNF- α

The determination of circulant TNF- α levels was carried out for 8 patients from the Isorel group and 12 from the control group. The Isorel group had an initial TNF- α level (day -10) of an average $24,43 \pm 5,39 \mu\text{m/ml}$ value, similar to that of the control group ($18,63 \pm 9,96 \mu\text{m/ml}$, $p=0.07$). Its level significantly increased, post immunotherapy, to $38,88 \pm 22,89 \mu\text{m/ml}$ ($p=0.05$) in the day of surgery (0), while post-operatory, albeit slightly lower in value at $33,69 \pm 24,03 \mu\text{m/ml}$ ($p=0.1$) on day +10, it remained significantly higher than that of the control group on day +10. $15,77 \pm 7,15 \mu\text{m/ml}$, $p=0.01$) (Fig. 5).

Study 3. The effect of *Viscum album* total extract on colorectal cancer patients' survival rate

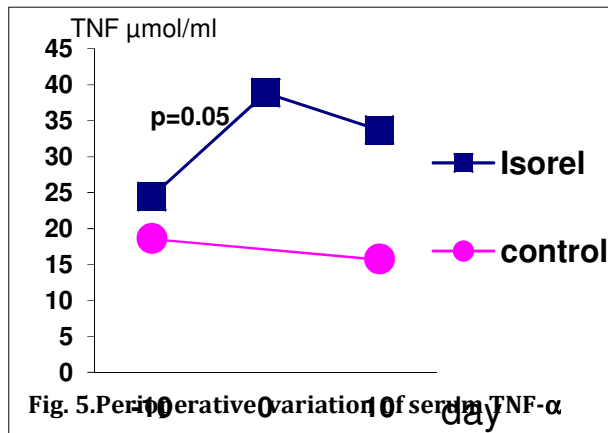
The study aims to assess the survival rate of patients who underwent surgery for advanced colorectal cancer, with or without metastasis, under the conditions of associating the *Viscum album* extract to modern chemotherapy, by means of a prospective study in the shape of a controlled randomized trial.

The patients - all patients admitted in the IV Surgical Clinic of UMPH Cluj with histologically confirmed colorectal carcinoma between October 1997 and October 2005, who met the inclusion criteria (resectable adenocarcinoma, age <85 years, without history of cancer, etc.). (309 cases)

Randomization: Sealed envelopes, blocks of 4

Surgical treatment: curative colorectal resection, resection of unique liver metastases when the surgery had curative purpose.

Chemotherapy: FU FOL (5-fluorouracil, 5FU + folinic acid) as monotherapy, as well as the combinations



FOLFIRI (leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecan) and FOLFOX (leucovorin, 5-fluorouracil, oxaliplatin)

Immunotherapy: ISOREL - 2 vials (120 mg) on days 1, 3 and 5 of the week, starting immediately after surgery and continuing without interruption for an average of 2 years (between 1 and 5 years). The administration was done by IV perfusion during hospitalization and, after discharge, patients continued the therapy by subcutaneous injection, in the same doses.

Analyzed parameters: Overall survival (Kaplan Meier survival curves compared by Log-Rank test or Cox's F), postoperative complications, side effects of immunotherapy administration

Results

The number of cases available for survival analysis was 124 (Table III)

Table III. Treatment group stratification according to Dukes tumor stage and chemotherapy type

	Dukes C stage		Dukes D stage	
	Immunotherapy: n = 41	Control n = 48	Immunotherapy: n = 17	Control n = 18
Chemotherapy regimen	35 (85%)	38 (79%)	15 (88%)	16 (88%)
FU FOL	19	20	8	8
FOLFIRI or FOLFOX	16	18	7	8
No chemotherapy	6	10	2	2

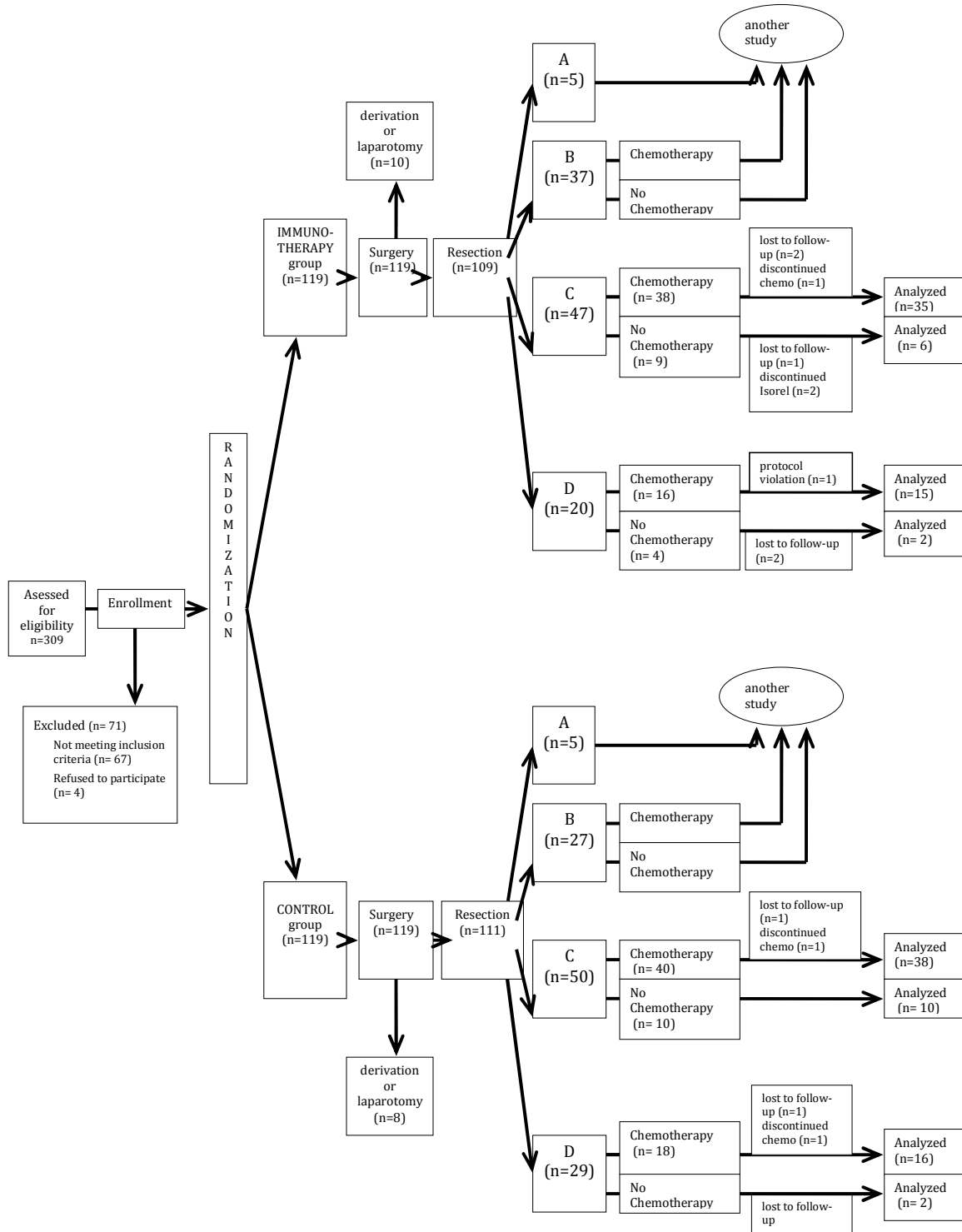


Fig 6. CONSORT study diagram

Specific overall cancer survival for patients with advanced stages (stages C + D together) was significantly higher for the Immunotherapy group in comparison with the control group: 5 year survival rates: 39,7% vs. 15,4%, average survival 41 vs. 27 months, with a median survival rate of 34,5 vs. 24 months and a significant difference between the Kaplan - Meier estimated survival curves compared by the Log-Rank test ($p < 0.0001$) (Fig. 7)

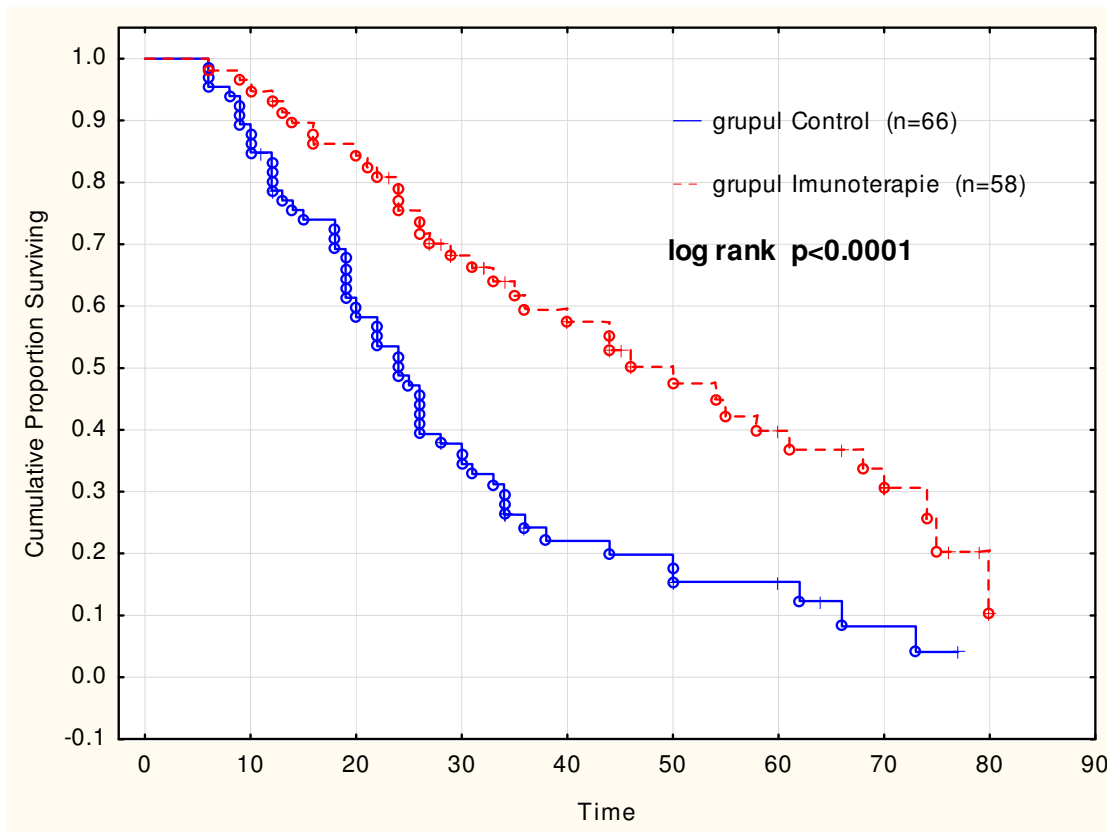


Fig. 7: Global survival assessment for stages C + D according to immunotherapy

Analyzed separately for each stage, C and D respectively, the survival rate differences between the Immunotherapy and Control treatment groups remain highly significant: Log-Rank $p < 0.0001$ for stage C (Fig. 8) and $p = 0.008$ for stage D (Fig. 9).

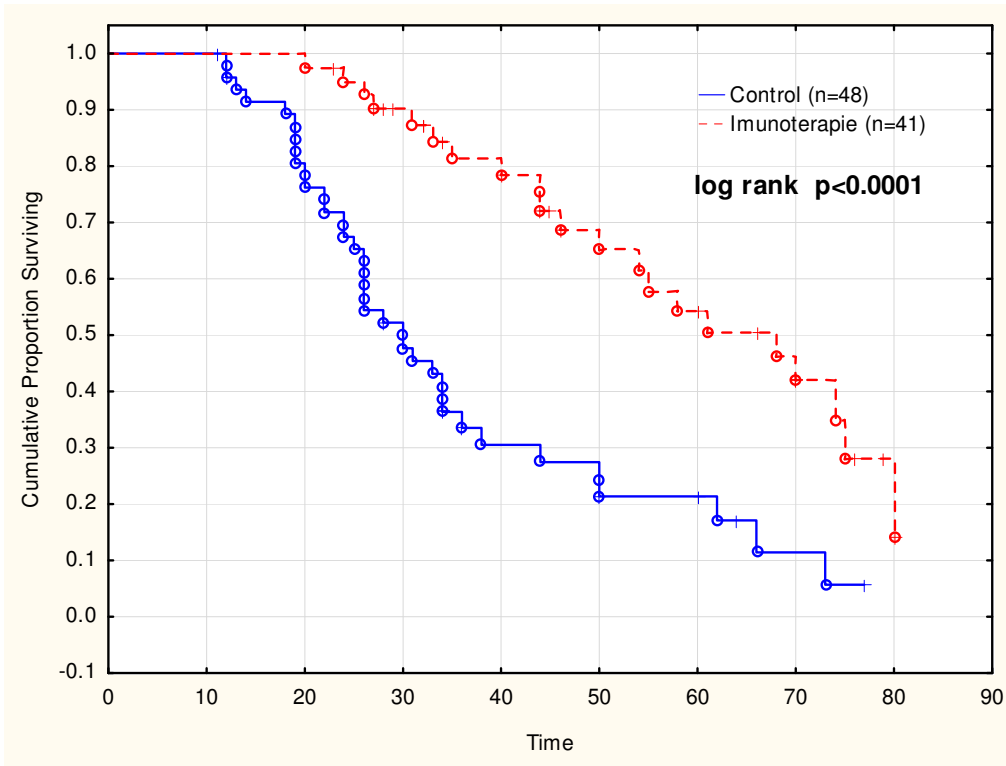


Fig. 8: Survival assessment for stage C according to immunotherapy

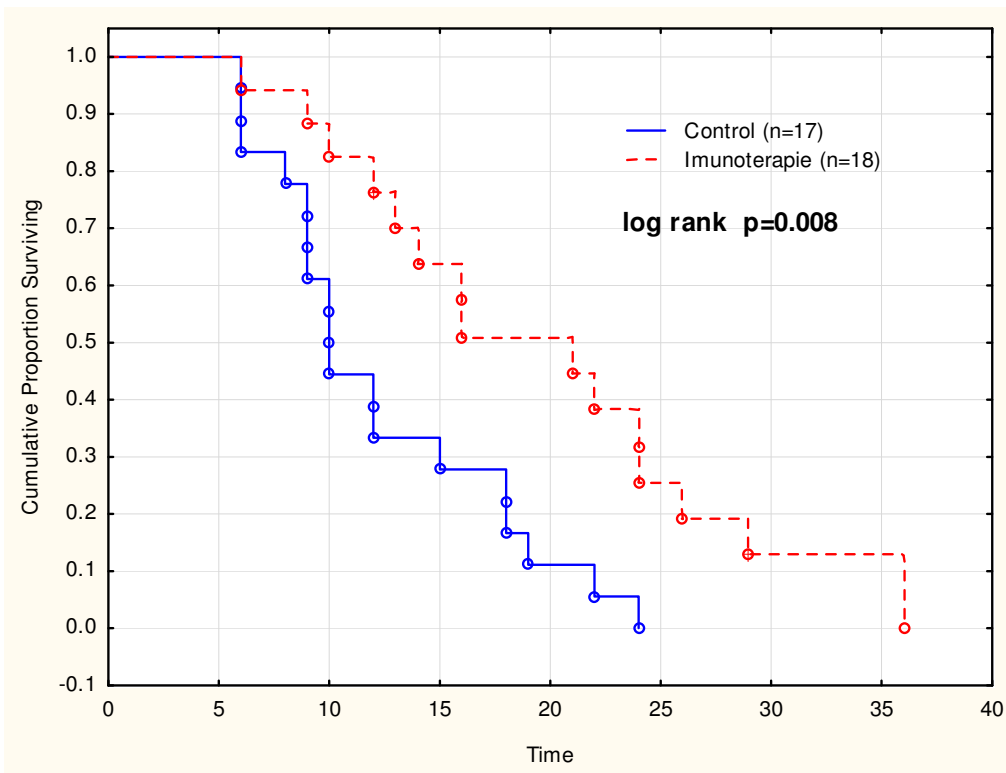


Fig. 9: Survival assessment for stage D according to immunotherapy

The stratified survival assessment according to chemotherapy, for each Dukes tumor stage, C and D respectively, shows (Table IV.):

- For stage C (Fig. 10): The highest survival rate is granted by Immunotherapy combined with FOLFOX or FOLFIRI type chemotherapy (median survival mS=57,5 months and 5 year survival rate of 64%).
- For stage D (Fig. 11): The highest survival rate is also granted by Immunotherapy combined with FOLFOX or FOLFIRI type chemotherapy

Table IV. Median survival (mS) and 5-year survival (S₅) or maximum survival rate (S_{max}) for immunotherapy and control treatment groups, stratified by Dukes tumor stage and chemotherapy type

	Dukes C stage		Dukes D stage	
	immunotherapy mS = 46 S ₅ = 42%	Control mS = 29 S ₅ = 17%	immunotherapy mS = 16 months S _{max} = 36 months	Control mS = 10 months S _{max} = 24 months
Chemotherapy regimen				
FU FOL	mS = 46 months S ₅ = 46,2%	mS = 24 months S ₅ = 17,4%	mS = 13,5 months S _{max} = 26 months	mS = 9,5 months S _{max} = 12 months
FOLFIRI or FOLFOX	mS = 57,5 months S ₅ = 64,2%	mS = 34 months S ₅ = 38,2%	mS = 24 months S _{max} = 36 months	mS = 18 months S _{max} = 24 months
No chemotherapy	mS = 27,5 months S _{max} = 46 months	mS = 29,5 months S _{max} = 34 months	mS = 18 months S _{max} = 24 months	mS = 7,5 months S _{max} = 9 months

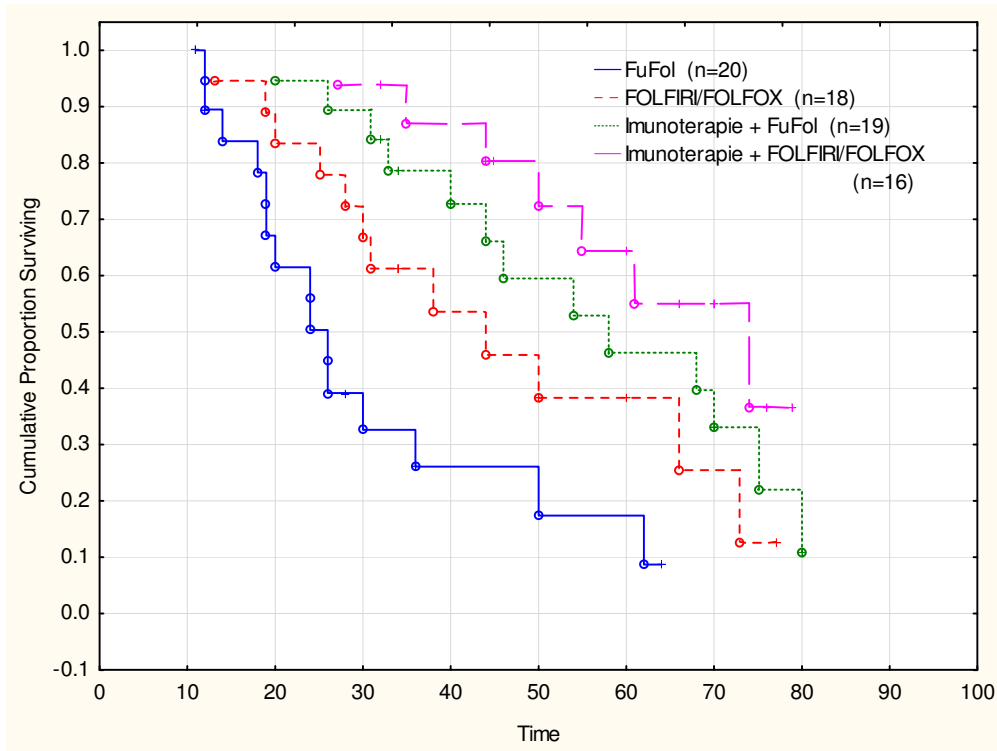


Fig.10. Survival assessment for stage C according to immunotherapy and chemotherapy type

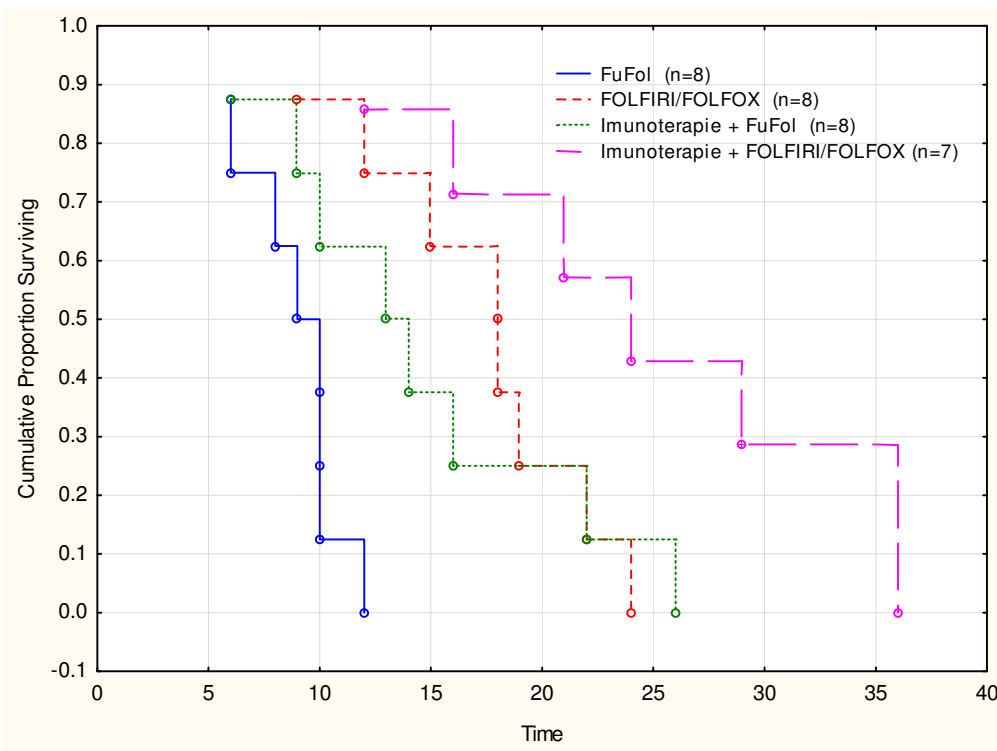


Fig.11. Survival assessment for stage C according to immunotherapy and chemotherapy type

The study also highlighted the significant differences of survival between sub-stages A, B and C within TNM III tumor stage (Dukes C), a very important aspect for this study, as the unusually high proportion of IIIC sub-stage, over 50% of all stage III cases (Fig. 12 a, b) and with a prognosis similar to that of stage IV, explains why the survival rates of this stage are lower than those cited in the literature.

From immunotherapy effects point of view, one observes yet again significantly higher survival rate in immunotherapy treated cases in comparison with control cases, for each of the sub-stages A, B or C, but especially for B and C. (Fig. 13,14,15)



Fig. 12 a. Dukes stage C respectively III TNM - the "Immunotherapy" group

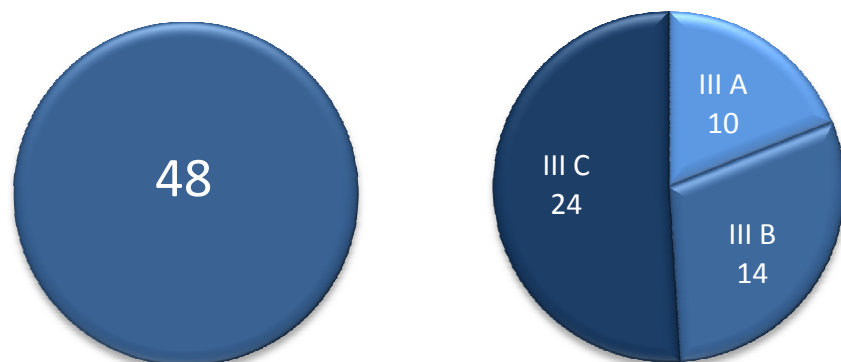


Fig. 12 b. Dukes stage C respectively III TNM - the "Control" group

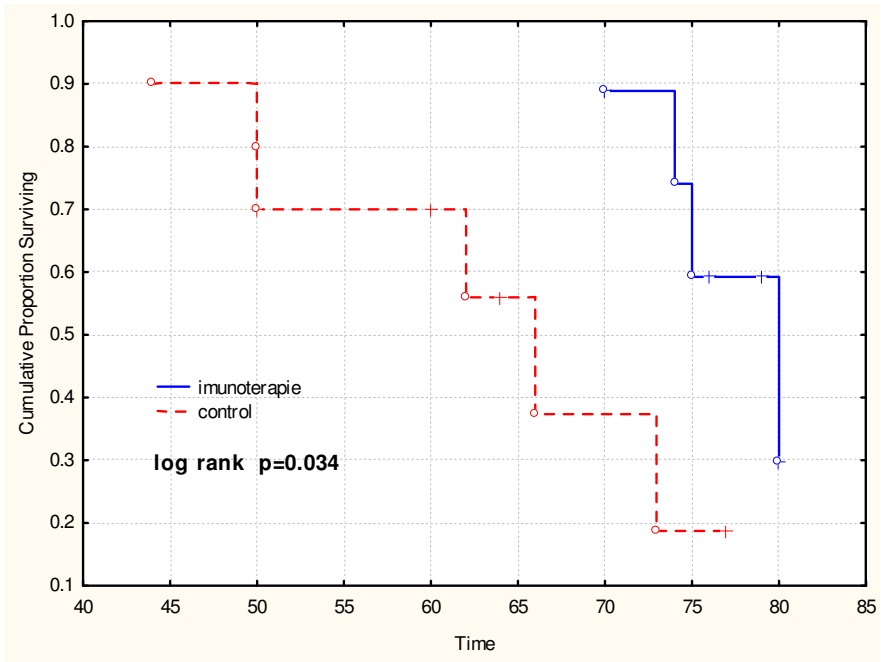


Fig. 13 Survival of sub-stage III A according to immunotherapy

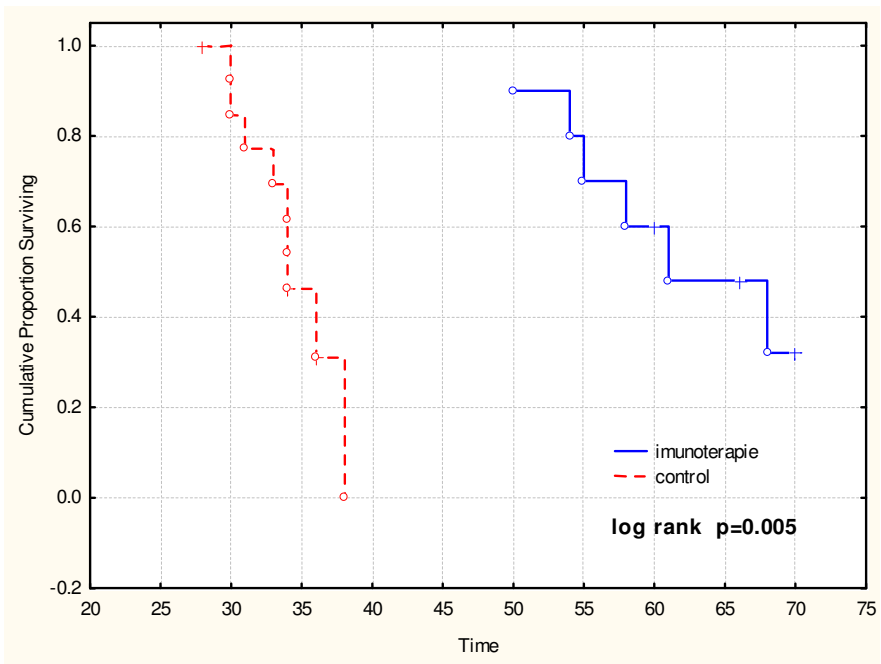


Fig. 14 Survival of sub-stage III B according to immunotherapy

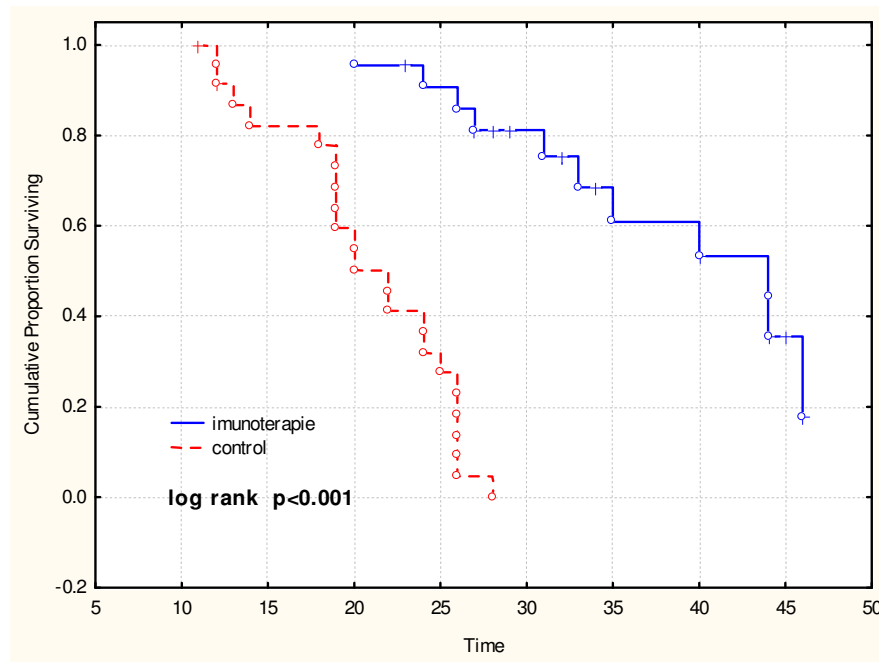


Fig. 15 Survivals of sub-stage III C according to immunotherapy

3. General conclusions

- Our IV administration protocol of therapeutic doses (60-120 mg/dose) of *Viscum album* L. extract - Isorel doesn't alter significantly the patients' biochemical, hematological, inflammatory or immunological constants and has no cardio-vascular or allergic-anaphylactic side effects.
- The administration of *Viscum album* L. extract - Isorel causes an intratumoral inflammatory response, materialized by a TIL number growing trend to the limit of statistical significance, but without a significant increase of peritumoral inflammatory response.
- The preoperative administration of *Viscum album* L. - Isorel causes a significant increase of TNF- α serum levels, which is maintained after surgery for at least 10 days, but which is not accompanied by a higher complication rate.
- The systematic postoperative administration of *Viscum album* L. extract - Isorel for an average 2 year period in patients with advanced CRC , increased the overall 5 year survival rates from 15,4% to 39,7%, the mean survival rate from 27 to 41 months, the median survival from 24 to 34,5 months, resulting in a

significant improvement of the Kaplan-Meier estimated survival curves (log-Rank $p < 0.0001$), in comparison to patients who did not undergo this immunotherapy.

- For Dukes stage C the highest survival rate is granted by Immunotherapy combined with FOLFOX or FOLFIRI type chemotherapy, resulting a median survival $mS = 57,5$ months and 5 year survival rate of 64%.
- For stage D the highest survival rate is also granted by Immunotherapy combined with FOLFOX or FOLFIRI type chemotherapy (median survival $mS = 24$ months, 2 year survival rate of 43% and maximum 36 month survival). For this type of therapy, the benefit from immunotherapy consists of an increase of median survival by 6 months.