

## IMUNOTERAPIA CU EXTRACT DE *VISCUM ALBUM* ÎN TRATAMENTUL CANCERULUI COLORECTAL AVANSAT

T. Oniu, M. Cazacu, V. Muntean, Melania Oniu, Anca Mihailov, C. Lungoci  
Clinica Chirurgie IV UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca  
Spitalul Clinic C.F. Cluj-Napoca

**VISCUM ALBUM EXTRACT IN THE TREATMENT OF ADVANCED COLORECTAL CANCER (ABSTRACT):** *Background:* Most clinical trials using mistletoe to treat colorectal cancer are out-of-date and have major methodological weaknesses that raise doubts about their findings. Meanwhile, the arsenal of chemotherapy has much evolved over the last decade. Thus, the aim of this study was to determine the effectiveness of the total plant extract Isorel in association with modern chemotherapy in the treatment of colorectal cancer. *Methods:* After the surgical removal of the primary tumor, a total of 124 patients with advanced colorectal cancer (stage Dukes C and D), were randomly divided into the immunotherapy group (Isorel associated in most of the cases with chemotherapy, n=58) and the control group (most of which received chemotherapy). The chemotherapy regimens were based on 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin. Overall survival and adverse events were observed. *Results:* The addition of immunotherapy with *Viscum album* extract Isorel to 5FU-based chemotherapy significantly improved overall survival in Dukes stage C (5-year survival: 46% vs. 17%; median survival: 46 vs. 24 months, p=0.004) and D (median survival: 13,5 vs. 9,5 months, p=0.02; longest survival: 26 vs. 12 months). The addition of immunotherapy to oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy further improved overall survival in Dukes stage C (5-year survival: 64% vs. 38%; median survival: 57,5 vs. 34 months, p=0.04) and D (median survival: 24 vs. 18 months, p=0.02; longest survival: 36 vs. 24 months). Inflammatory local reactions at the s.c. injection site occur frequently (83% of patients) at the beginning of the treatment for 1 to 8 weeks. *Conclusions:* Immunotherapy with *Viscum album* extract Isorel, added to chemotherapy, improves the survival of the patients operated for advanced colorectal cancer compared with chemotherapy alone, whatever its type.

KEY WORDS: ADVANCED COLORECTAL CANCER, IMMUNOTHERAPY, MISTLETOE EXTRACT, SURVIVAL ANALYSIS, CHEMOTHERAPY, FOLFIRI, FOLFOX.

Correspondență: Dr. Traian Oniu, Clinica Chirurgie IV, Spitalul Clinic C.F. Cluj-Napoca, e-mail: traianoniu@yahoo.com\*.

### INTRODUCERE

Există puține studii comparative prospective, trialuri randomizate controlate sau nu, în domeniul terapiei cu extracte de *Viscum album* a cancerului colorectal, care să intrunească criteriile de calitate pe care le solicita actualmente conceptul de medicină bazată pe dovezi [1-4].

Multe dintre studii sunt vechi, realizate înainte de anul 2000, perioadă în care din punct de vedere al chimioterapiei nu existau decât regimurile bazate pe 5-fluorouracil. În ultimele decade însă, arsenalul chimioterapiei cancerului colorectal s-a îmbogățit cu noi agenți precum irinotecanul sau oxaliplatinul, dar efectul asocierii acestora cu extractele de vâsc nu a fost încă studiat în cadrul unor trialuri.

---

\* received date: 03.06.2011

accepted date: 28.10.2011

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

### MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul este un trial clinic prospectiv, randomizat și controlat (TRC) conceput pentru a evalua efectele clinice ale administrării unui extract total de *Viscum album*, complementar la terapiile oncologice moderne ale cancerului colorectal (CCR).

Au fost evaluați pentru a intra în studiu toți pacienții care s-au adresat Clinicii Chirurgie IV a UMF Cluj-Napoca cu carcinoame colorectale în perioada octombrie 1997 – octombrie 2005 (309 cazuri).

Criteriile de excludere au fost: vârsta peste 85 ani, tumorile colorectale nerezecabile, urgențele (necesitatea intervenției chirurgicale de urgență pentru complicații), antecedente personale de alte neoplazii, tratamente oncologice neo-adjuvante (radio-, chimio-, hormono-, imuno-terapie), orice imunoterapie în ultimii 5 ani (vaccinuri, imunoglobuline, toxine etc., cu excepția vaccinului tetanic adsorbit VTA).

Pacienții eligibili pentru rezecții colorectale electivă au fost randomizați preoperator în două grupuri de tratament: *grupul cu imunoterapie* – urmând să beneficieze postoperator de imunoterapie cu extract de *Viscum album* alături de chimioterapie și *grupul de control* – urmând să beneficieze postoperator doar de chimioterapie.

La momentul intervenției chirurgicale, cazurile la care tumora primitivă nu a putut fi rezecată în limite de siguranță oncologică (operația Hartman, derivații externe, cazuri inoperabile – carcinomatoză peritoneală etc.) au fost excluse din studiu (beneficiind însă în continuare de chimioterapie și imunoterapie cu scop paliativ în afara studiului).

Postoperator, pe baza rezultatului anatomopatologic, pacienții au fost stadializați conform clasificării Dukes și apoi au efectuat tratamentul corespunzător grupului în care fusesera alocați. Trialul a evaluat efectul imunoterapiei pentru toate stadiile Dukes ale cancerului colorectal, A, B, C și D, însă prezentul articol prezintă doar analiza supraviețuirii pentru stadiile avansate, Dukes C și D (Fig. 1).

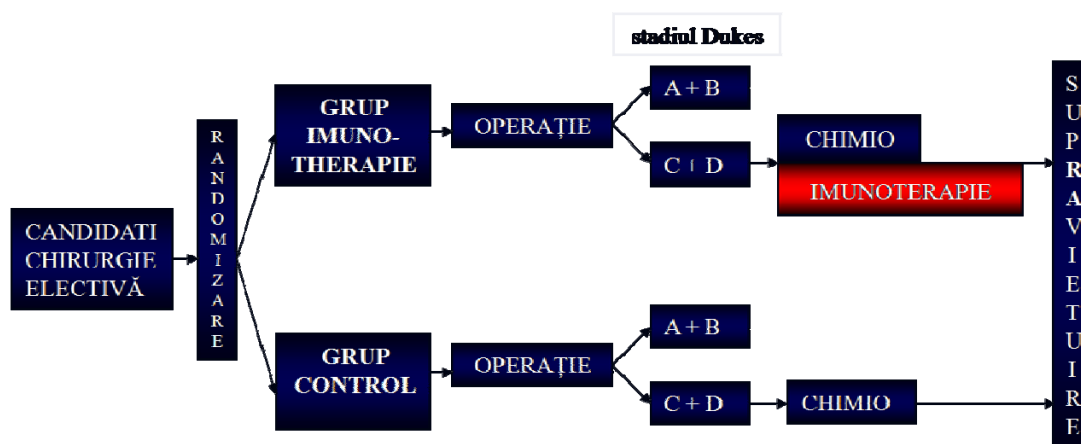


Fig. 1 Designul studiului

Randomizarea s-a făcut prin alocarea în cele 2 grupuri de tratament, preoperator la momentul stabilirii stadializării preoperatorii și indicației de tratament chirurgical, după obținerea consimțământului informat al pacienților. Repartizarea randomizată s-a realizat în blocuri de câte patru. Decizia de alocare a fost introdusă sigilată în foaia de observație a pacientului și a fost desigilată după stabilirea stadializării finale anatomo-patologice și a indicației de chimioterapie.

Pregătirea preoperatorie a constat în laxative ușoare (ulei de parafină), dietă săracă în fibre și antibiotice per os: eritromicină și metronidazol, pe o durată de 5-7 zile.

Intervențiile chirurgicale au fost realizate în anestezie generală AG-IOT (uneori combinată cu anestezia peridurală) de către una și aceeași echipă operatorie cu scopul de a minimiza bias-ul legat de calitatea actului chirurgical. La toate cazurile s-a practicat extirparea în limite de siguranță oncologică a tumorii primare colorectale. Rezecția metastazelor hepatice a fost efectuată în cazul metastazelor unice prin rezecție marginală hepatică atipică, segmentectomii sau bisegmentectomii doar atunci când caracterul întregii intervenții chirurgicale avea viză curativă (radicalitate oncologică), absența metastazelor multiple, diseminate, fiind exclusă cu ajutorul ecografiei intraoperatorii după anul 2000.

Preparatul de vâsc utilizat a fost Isorel<sup>®</sup> A (A= Abietis = Viscum album crescut pe brad), concentrația 60 (1 fiolă conținând 1 mL extract apos obținut din 60 mg plantă totală de vâsc, concentrație uzual specificată ca și 60 mg/ml) (Novipharm GmbH. – Austria).

Doza administrată a fost de 2 fiole (120 mg), în fiecare din zilele 1,3 și 5 ale săptămânii, începând din perioada imediat postoperatorie și continuând neîntrerupt în medie până la 2 ani postoperator (cu limite între 1 și 5 ani). În cursul spitalizării postoperatorii precum și a spitalizărilor ulterioare pentru efectuarea chimioterapiei, administrarea a fost făcută intravenos, în perfuzie, 2 fiole în 500 ml ser fiziologic, administrate în decurs de 2 ore. După externare pacienții au continuat terapia prin injectare subcutanată, în aceleași doze, cu alternarea a 4 zone de injectare (deltoidian și la coapsa, bilateral).

Regimurile de chimioterapie au inclus 5-FU (5-fluorouracil) + acid folinic, ca monoterapie (protocoalele FUFOL Mayo și LV5FU2 de Gramont), incluse ambele în continuare sub abrevierea Fu-Fol precum și combinațiile FOLFIRI (leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecan) și FOLFOX (leucovorin, 5-fluorouracil, oxaliplatin).

Tratamentele au respectat standardele curente de chimioterapie; progresiv, după anul 2000-2001, regimurile de 5FU în bolus au fost înlocuite în majoritatea cazurilor cu administrarea continuă conform protocolului De Gramont iar după apariția moleculelor de generația a II-a, Irinotecan și apoi Oxaliplatin, acestea au fost utilizate tot mai mult pe măsură ce au devenit disponibile.

Toxicitatea chimioterapiei a fost cuantificată conform National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC v.1 1994 - v.2 1999)

După externare, pacienții au revenit inițial, în decursul primelor 6 luni, la interval de 1 lună pentru efectuarea chimioterapiei în departamentul nostru de oncologie, ocazii cu care au fost monitorizate efectele adverse ale imunoterapiei și au fost recoltate probe biologice/imunologice destinate unui studiu complementar asupra variației diferitelor sub-populații limfocitare în condițiile imuno-chimioterapiei.

Din punct de vedere oncologic controalele postoperatorii au urmărit recomandările ASCO 2000; au fost efectuate la interval de 3 luni în primul an, 6 luni până la 3 ani și ulterior anual, anamneza, examenul clinic complet, examinarile de laborator uzuale, hematologice și biochimice.

La interval de 6 luni până la 3 ani și apoi anual s-au efectuat: ACE - antigenul carcinoembrionar (doar în cazurile în care fusese crescut inițial), ecografie abdominală și/sau computer-tomografie, și radioscopie toracică. Colonoscopia a fost efectuată anual în primii 3 ani și apoi la interval de 2-3 ani. Recidivele locale au fost tratate prin re-rezecție, derivații și chimioterapie paliativă iar recidivele la distanță, în cazul pacienților Dukes C, prin chimioterapie paliativă.

Principalul parametru (endpoint) analizat a fost supraviețuirea specifică de cancer. Aceasta a fost calculată de la momentul intervenției chirurgicale și până la ultimul control postoperator (cazuri considerate „censored”) sau momentul confirmat al decesului (cazuri considerate „completed”).

Pacienții care nu s-au mai prezentat la controale, cazurile de recidivă locală care au suferit o re-rezecție și pacienții care au decedat din motive independente de cancer (accidente, afecțiuni cardiace, neurologice etc.) au fost încadrați în categoria de pacienți „censored” (fiind considerați pierduți din evidență la momentul ultimului control, re-rezecției sau decesului).

Curbele de supraviețuire Kaplan Meier și compararea acestora prin testul Log-Rank sau Cox's F (pentru grupurile mai mici de pacienți și fără cazuri “censored”), au fost făcute cu softul StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10.

Obiectivul secundar l-a constituit evaluarea efectelor adverse ale imunoterapiei. Au fost urmărite sub forma unui studiu descriptiv toate efectele adverse care țin de administrarea preparatului, cunoscute din literatură și experiența anterioară a autorului: reacții locale la locul injectării, urticarie, rinită, conjunctivită, febră înaltă, mialgii, edem Quincke, colită alergică, stare pseudo-gripală, crize de astm/dispnee, hipotensiune și șoc anafilactic.

Intensitatea reacțiilor locale la locul injectării a fost cuantificată empiric în 4 grade: 1 = eritem și edem circumscris cu diametrul maxim < 5 cm, 2 = eritem și edem circumscris cu diametrul 5-10 cm, 3 = edem și congestie a unui segment de membru (braț, coapsa) și 4 = edem și congestie al întregului membru.

## REZULTATE

În decurs de 8 ani au fost evaluate pentru includerea în studiu un număr de 309 cazuri de cancer colorectal. Nu au îndeplinit criteriile de includere 67 de pacienți iar alții 4 au refuzat să participe la studiu. Restul au fost randomizați în cele două grupuri de tratament: „Imunoterapie” și “Control”, a câte 119 cazuri. Durata de urmărire a cazurilor a fost de minim 5 ani.

Dupa excluderea din studiu a cazurilor care s-au dovedit nerezecabile din punct de vedere al tumorii primare colorectale și consecutiv unei rate de retragere din studiu, pentru stadiile C+D de 9/67 cazuri în grupul Imunoterapie și 13/79 cazuri în grupul Control, numărul de cazuri disponibil pentru analiza supraviețuirii a fost de 58 pacienți în grupul Imunoterapie (41 în stadiul Dukes C și 17 în stadiul Dukes D) și 66 pacienți în grupul Control (48 în stadiul Dukes C și 18 în stadiul Dukes D) (Fig. 2)

În vederea analizei supraviețuirii, cazurile au fost stratificate în funcție de stadiul tumoral Dukes, obținându-se subgrupurile de Imunoterapie și Control pentru fiecare din stadiile C și D.

Chimioterapia a fost efectuată în proporții similare, între 79-88%, în cadrul fiecărui subgrup.

Având în vedere echivalența recunoscută a schemelor de chimioterapie FOLFOX și FOLFIRI, pacienții care au efectuat aceste protocoale au fost grupați într-o singură categorie denumită FOLFOX /FOLFIRI.

Ca efect al randomizării și al trecerii, în decursul desfășurării studiului, de la 5 FU la protocoalele moderne de chimioterapie, au rezultat numere similare de pacienți care au primit cele două tipuri de chimioterapie în cadrul fiecărui stadiu Dukes, obținându-se astfel subgrupuri apropiate numeric în vederea comparării lor statistice (Tabel I).

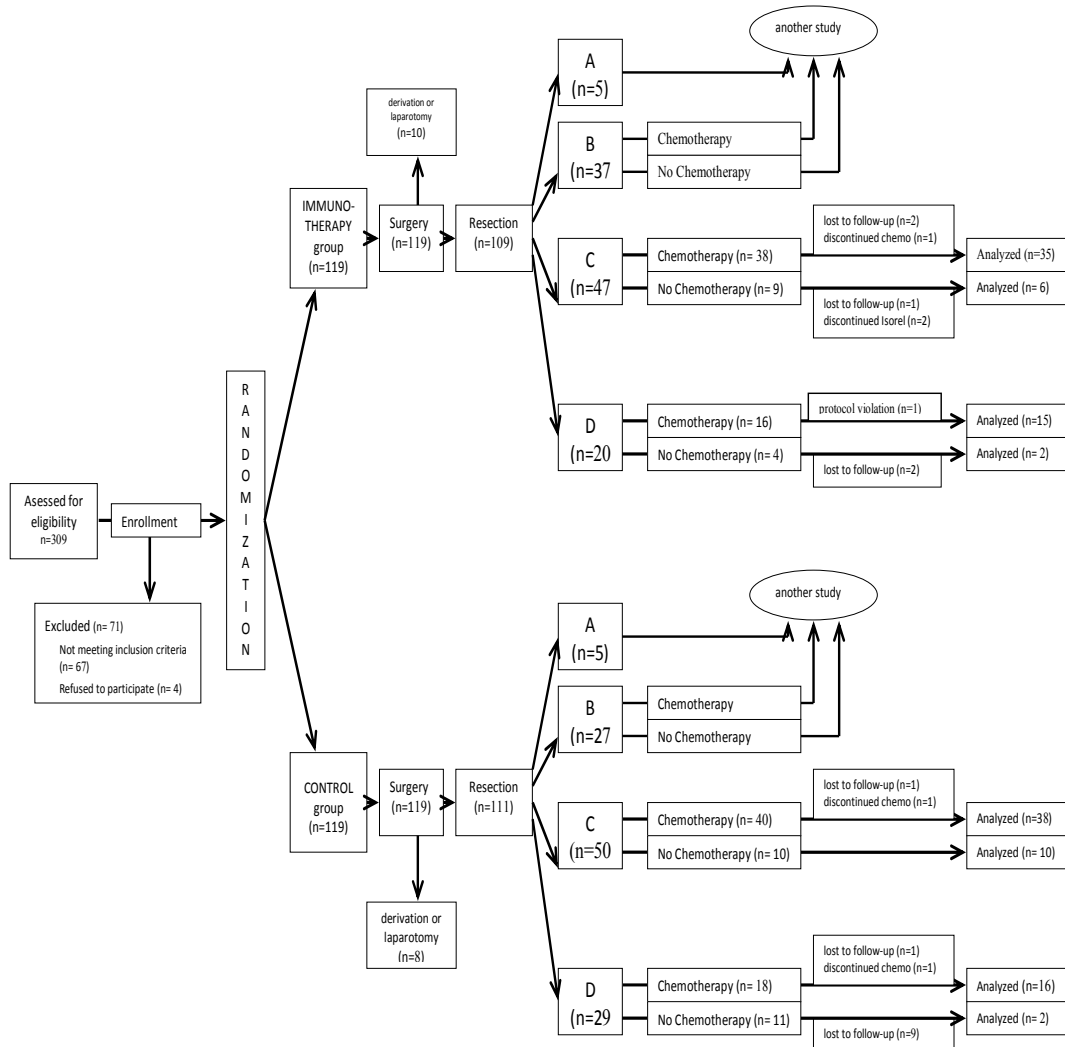


Fig. 2 Diagrama CONSORT

Caracteristicile clinice și anatomo-patologice ale cazurilor celor două grupuri de tratament, pentru fiecare stadiu tumoral în parte nu au fost semnificativ diferite (Tabel 2,3)

**Tabel 1**  
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
<b>Regim chimioterapie</b>	<b>35 (85%)</b>	<b>38 (79%)</b>	<b>15 (88%)</b>	<b>16 (88%)</b>
FU FOL	19	20	8	8
FOLFIRI sau FOLFOX	16	18	7	8
<b>Fără chimioterapie</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

**Tabel 2**  
Caracteristicile clinice și anatomo-patologice ale cazurilor din stadiul Dukes C

STADIUL Dukes "C"	Imunoterapie n = 33	Control n = 44
<b>Vârsta (ani)</b>		
<b>medie</b>	54	58
<b>limite</b>	24-71	50-74
<b>Sex M:F</b>	21 : 14	23 : 22
<b>Localizarea tumorală *</b>		
<b>Colon drept</b>	7	9
<b>Colon stâng</b>	4	7
<b>Colon sigmoid</b>	7	7
<b>Joncțiune rectosigmoidiană</b>	9	11
<b>Rect</b>	11	13
<b>Localizare multiplă</b>	3	1
<b>Grad de diferențiere histologică</b>		
<b>Diferențiat</b>	26	29
<b>Mucinos</b>	12	18
<b>Nediferențiat</b>	3	1
<b>Operația</b>		
<b>Colectomie totală</b>	1	1
<b>Hemicolectomie dreaptă</b>	4	4
<b>Hemicolectomie dreaptă lărgită</b>	4	5
<b>Rezecție segmentară colon transvers</b>	0	0
<b>Hemicolectomie stângă</b>	4	5
<b>Hemicolectomie stângă extinsă</b>	2	2
<b>Rezecție segmentară colon sigmoid</b>	6	5
<b>Rezecție rectosigmoidiană (Dixon)</b>	12	14
<b>Rezecție rectală Babcock Bacon</b>	0	5
<b>Amputație rectală Miles</b>	7	5
<b>Rezecție Hartmann</b>	1	2

Intervențiile chirurgicale au constat din îndepărtarea completă a tumorii primare și a teritoriului limfatic aferent; în nici un caz nu s-a efectuat o procedură paliativă (nici în cazul celor trei rezecții Hartmann).

**Tabel 3**  
Caracteristicile clinice și anatomo-patologice ale cazurilor din stadiul Dukes D

STADIUL Dukes "D"	Imunoterapie n = 17	Control n = 18
<b>Vârsta (ani)</b>		
<b>medie</b>	56	60
<b>limite</b>	26-76	28-73
<b>Sex M:F</b>	10 : 7	10: 8
<b>Localizarea tumorală</b>		
<b>Colon drept</b>	3	3
<b>Colon transvers</b>	1	1
<b>Colon stâng</b>	1	1
<b>Colon sigmoid</b>	5	7
<b>Joncțiune rectosigmoidiană</b>	4	2
<b>Rect</b>	3	2
<b>Localizare multiplă</b>	0	2
<b>Grad de diferențiere histologică</b>		
<b>Diferențiat</b>	12	12
<b>Mucinos</b>	4	6
<b>Nediferențiat</b>	1	
<b>Operația</b>		
<b>Recto-colectomie totală</b>	0	1
<b>Colectomie totală</b>	0	1
<b>Hemicolectomie dreaptă</b>	3	3*
<b>Rezecție segmentară colon transvers</b>	0	1
<b>Hemicolectomie stângă</b>	1	1
<b>Recto-hemicolectomie stângă</b>	0	1
<b>Rezecție segmentară colon sigmoid</b>	6	2
<b>Rezecție rectosigmoidiană (Dixon)</b>	3	7
<b>Rezecție rectală Babcock Bacon</b>	1	1
<b>Amputație rectală Miles</b>	3	0
<b>Rezecția metastazelor hepatice</b>	1	2

\* 1 pacient din grupul Control avea un adenocarcinom apendicular invadant în mezosigma, necesitând și o rezecție segmentară sigmoidiană pe lângă hemicolectomia dreaptă

Rezecția metastazelor hepatice la pacienții din stadiul D a fost posibilă în 3 cazuri: segmentectomie hepatică (segment VI) la un pacient din grupul Imunoterapie și câte o bi-segmentectomie (VI-VII) și rezecție marginală hepatică la pacienți din grupul Control. Restul pacienților din stadiul D aveau metastaze hepatice multiple diseminate, inabordabile chirurgical.

Complicațiile postoperatorii au survenit la 15/58 pacienții (25,8%) din grupul Imunoterapie comparativ cu 22/66 cazuri (33,3%) în grupul Control, diferența nefiind statistic semnificativă ( $p=0.36$ ) (Tabel IV). În grupul Imunoterapie complicațiile au fost în general minore, cu excepția unei fistule urinare complexe care a necesitat reintervenție chirurgicală. În grupul Control complicațiile minore au fost asemănătoare dar au existat complicații grave la 2 pacienți (3%): un caz de ileus mecano-inflamator necesitând reintervenție chirurgicală și un caz de bronho-pneumonie severă cu insuficiență respiratorie necesitând ventilație asistată.

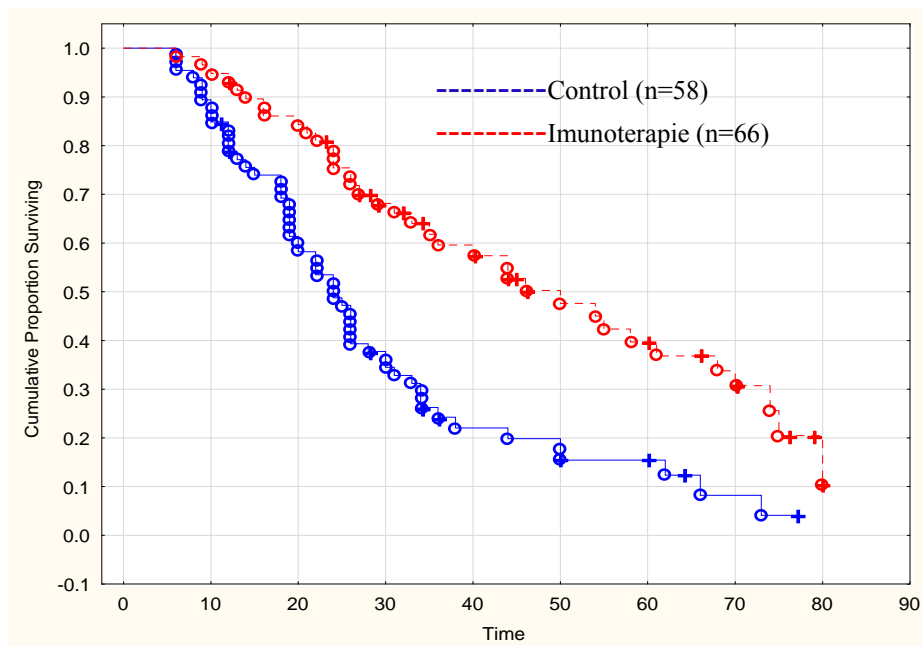
Proporția complicațiilor infecțioase (supurația plăgii, pneumonie, infecție urinară) fost mai redusă la pacienții cu imunoterapie față de control, 10,3% vs. 16,7%, fara a se atinge însă pragul de semnificație statistică ( $p=0.30$ ).

**Tabel 4**  
Complicații postoperatorii

grup Imunoterapie n = 58		grup Control n = 66	
		Ileus post-op	1
Pneumonie	1	Bronhopneumonie	1
Hematom al plăgii	1	Pneumonie	1
Supurația plăgii	2	Supurația plăgii	4
Incontinență urinară	2	Retenție de urină	3
Retenție de urină	2	Incontinență urinară	2
Fistulă urinară complexă	1	Varicoflebită	1
Tromboflebită distală	2	Tromboză distală	1
Flebită superficială	1	Depresie psihică	1
Infecție urinară	3	Fistulă anastomotică	1
		Pancreatita ușoară	1
		Infecție urinară	5
Total n=15 (26%)		Total n=22 (33%)	

Toate complicațiile au fost tratate corespunzător, astfel încât nu s-au înregistrat decese în perioada postoperatorie.

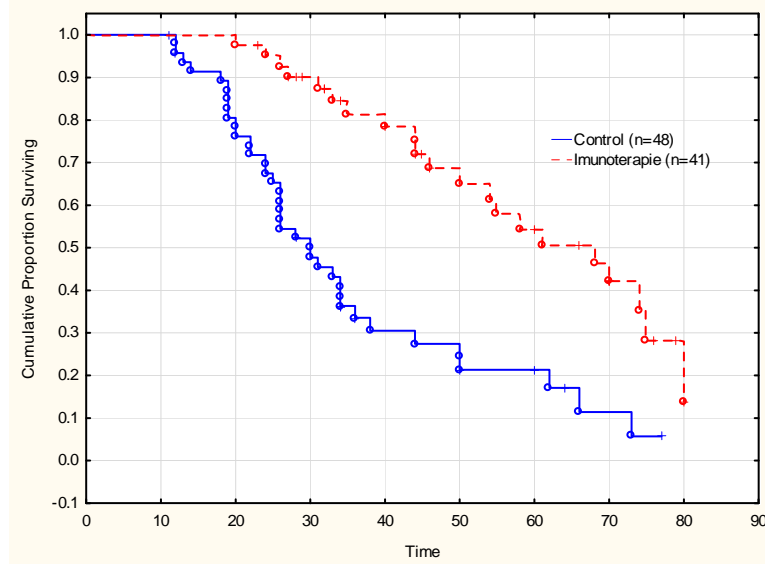
Supraviețuirea globală specifică de cancer pentru pacienții cu stadii avansate (stadiile C+D împreună) a fost semnificativ mai mare pentru grupul Imunoterapie comparativ cu grupul Control: ratele de supraviețuire la 5 ani: 39,7% vs. 15,4%, supraviețuirea medie 41 vs.27 luni, cu o mediană a supraviețuirii de 34,5 vs. 24 luni și cu o diferență semnificativă între curbele estimate de supraviețuire Kaplan – Meier comparate prin testul Log-Rank ( $p<0.0001$ ) (Figura 3).



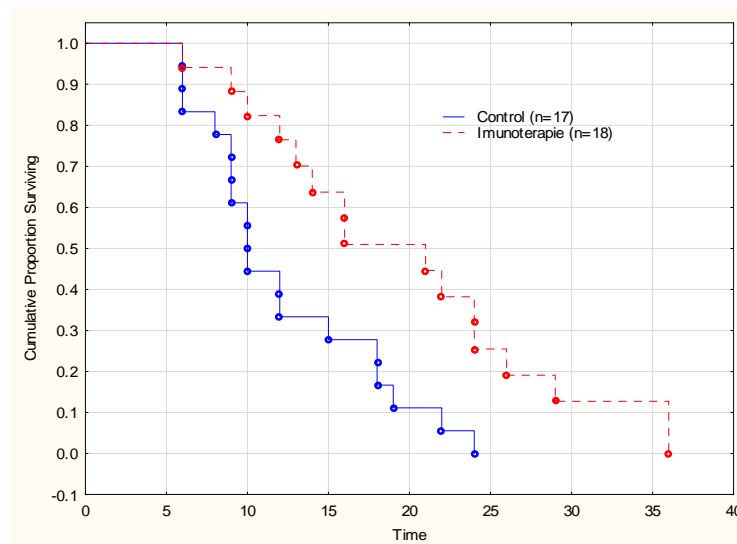
**Fig. 3** Evaluarea globală a supraviețuirii pentru stadiile C+D în funcție de imunoterapie



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. 4) și  $p = 0.008$  pentru stadiul D (Fig. 5).



**Fig. 4** Evaluarea a supraviețuirii pentru stadiul C în funcție de imunoterapie



**Fig. 5** Evaluarea a 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 6):

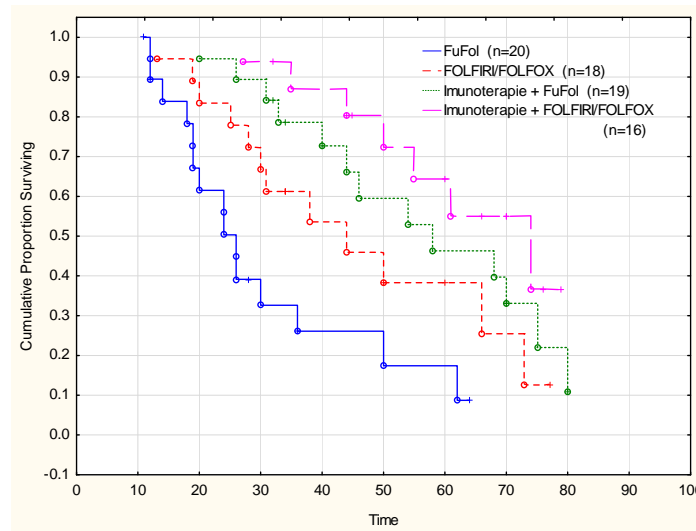
Pentru stadiul C (Fig. 6): cea mai mare supraviețuire o oferă Imunoterapia în combinație cu chimioterapia de tip FOLFOX sau FOLFIRI (mediana supraviețuirii mS= 57,5 luni și supraviețuirea la 5 ani 64%).

Diferența față de Imunoterapie+FuFol se apropie de limita semnificației statistice (Cox's F-Test  $p=0.07$ ) dar este semnificativă față de restul protoalelor de tratament: Log-Rank  $p=0.04$  față de FOLFOX /FOLFIRI și Log-Rank  $p=0.0007$  față de FuFol. De asemenea este semnificativă statistic diferența de supraviețuire între FuFol și Imunoterapie + FuFol (Log-Rank  $p=0.004$ )

**Tabel 5**

Mediana supraviețuirii (mS) și rata supraviețuirii la 5 ani ( $S_5$ ) sau supraviețuirea maximă ( $S_{max}$ ) pentru grupurile de tratament Imunoterapie și Control, stratificate pe stadii tumorale Dukes și tipul de chimioterapie

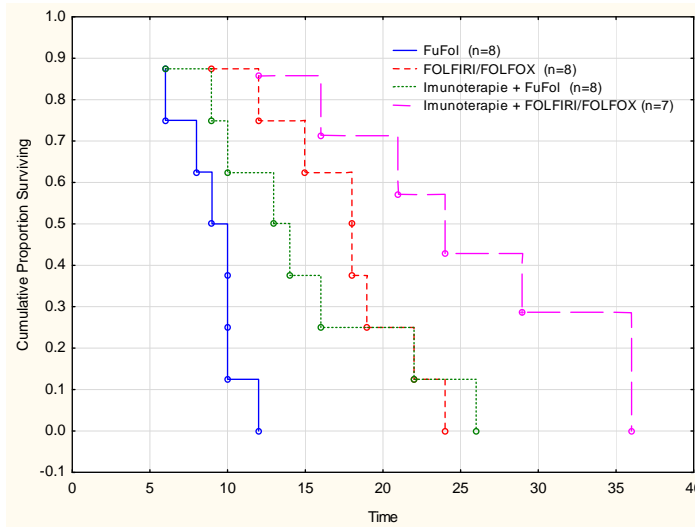
	Stadiul Dukes C		Stadiul Dukes D	
	Imunoterapie mS = 46 $S_5$ = 42%	Control mS = 29 $S_5$ = 17	Imunoterapie mS = 16 luni $S_{max}$ = 36 luni	Control mS = 10 luni $S_{max}$ = 24 luni
<b>Regim chimioterapie</b>				
FU FOL	mS = 46 luni $S_5$ = 46,2%	mS = 24 luni $S_5$ = 17,4%	mS = 13,5 luni $S_{max}$ = 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
<b>Fără chimioterapie</b>	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. 6** Evaluarea a supraviețuirii pentru stadiul C în funcție de imunoterapie și tipul de chimioterapie

Pentru stadiul D (Fig. 7): 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).

Curba de supraviețuire pentru acest tratament este statistic semnificativ mai bună față de curbele pentru restul tratamentelor, respectiv în ordinea descrescătoare a supraviețuirii: Imunoterapia+FuFol (Cox's F test  $p=0.017$ ), FOLFIRI/FOLFOX (Cox's F test  $p=0.025$ ) și FuFol (Cox's F test  $p=0.001$ ).

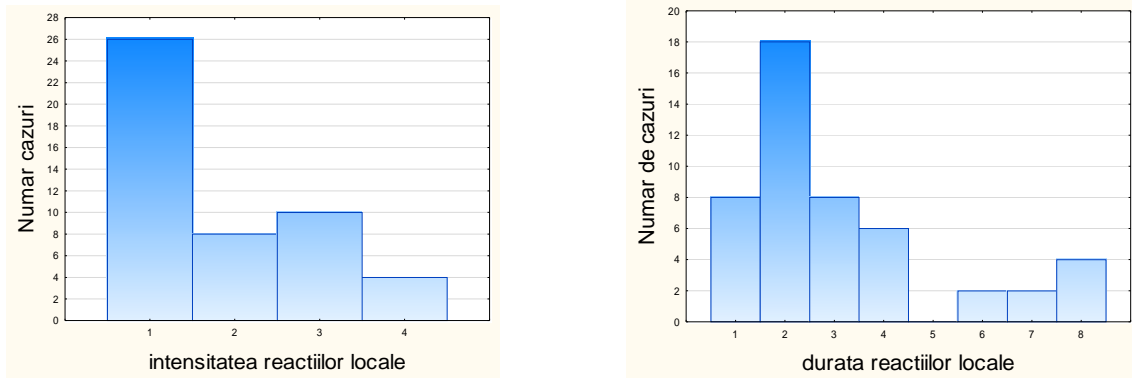


**Fig. 7** Evaluarea a supraviețuirii pentru stadiul D în funcție de imunoterapie și tipul de chimioterapie

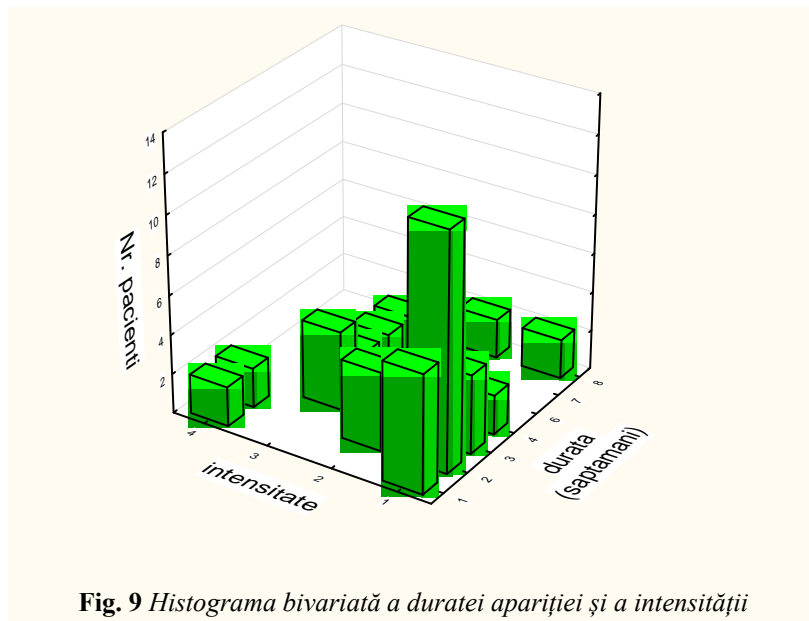
Protocoalele de chimioterapie au fost aplicate în total la un număr de 104 pacienți, Fu-Fol la 55/104, FOLFIRI 38/104 și FOLFOX la 11/104 pacienți. **Toxicitatea** a variat în funcție de protocolul de chimioterapie. Pentru Fu-Fol s-au înregistrat neutropenie 12,7%, diaree 7,3% și greață 1,8% din cazuri. Pentru FOLFIRI s-au înregistrat: anemie la 36,8% din cicluri, neutropenie la 23,7%, trombocitopenie la 6%, diaree la 84,2%, greață-vărsături la 81,6%, astenie la 78,9% din cicluri, toxicitate neurologica la 4% din pacienți; majoritatea toxicităților au fost de gradul 1-2, cele de gradul 3-4 având o incidență redusă (neutropenie 0,5% și greață-vărsături 1% din cicluri). Pentru FOLFOX s-au înregistrat: anemie la 25,5% din cicluri, neutropenie la 12%, trombocitopenie la 2%, diaree la 37,5%, greață-vărsături la 78%, astenie la 83% din cicluri; majoritatea toxicităților au fost de gradul 1, cele de gradul 3 având o incidență foarte redusă (diaree la 0,5% și greață-vărsături la 1% din cicluri). Toxicitatea neurologica, cu model cumulativ, la momentul celui de-al 6-lea ciclu a fost de gr.1 la 44% și de gr.2 la 38% din pacienți. La aceste date asupra toxicității se adaugă 3 cazuri de toxicitate gr 4 la care s-a întrerupt chimioterapia și care au fost rețrași din studiu (vezi diagrama studiului).

Studiul a urmărit la modul descriptiv **efectele adverse** ale administrării extractului de *Viscum album*. Reacțiile locale la locul injectării subcutanate au apărut la 48/58 (83%) pacienți analizați însă a reprezentat motivul întreruperii tratamentului și consecutiv a excluderii din studiu pentru un singur caz, la care intensitatea a fost de gradul 4. Aceste reacții apar la 12-24 ore de la injectarea subcutanată și se remit în decurs de 2-5 zile. Cum pacienții utilizează alternativ cele 4 arii de injectare, la momentul următoarei injectări, după 9-10 zile, reacția inflamatorie este deja remisă.

După o anumită perioadă injectările nu mai declanșează reacții inflamatorii locale, această perioadă de timp fiind denumită în studiu ca „durată a reacțiilor locale”. Cele mai multe reacții, 26/48 de cazuri, au avut o intensitate ușoară de gr.1 și cel mai frecvent, la 18/48 cazuri, durata de apariție a lor a fost de 2 săptămâni de la începerea administrării subcutanate (Fig. 8). Cea mai lungă durată de apariție a reacțiilor locale a fost de 8 săptămâni, fiind înregistrată la 4 cazuri, dar nu a depășit ca intensitate gradul 2. Cea mai mare intensitate a reacțiilor, de gradul 4, a fost înregistrată la 4 cazuri însă durata apariției lor nu a depășit 2 săptămâni (Fig. 9).



**Fig. 8** Intensitatea și durata de apariție a reacțiilor inflamatorii locale la injectarea subcutanată



**Fig. 9** Histograma bivariată a duratei apariției și a intensității reacțiilor inflamatorii locale la injectarea subcutanată

Din cauză că reacțiile generale la administrarea preparatului de Viscum album nu sunt clar definite în literatură și nu pot fi net distinse față de fenomenele de toxicitate ale chimioterapiei, ele au fost evaluate pentru primele 6 luni doar la pacienții care nu urmau chimioterapie, ceea ce constituie un lot prea mic de studiu (n=8).

Totuși, dintre aceștia menționăm un caz care manifesta transpirații, amețeli și palpitații în ziua injecției subcutanate dar obiectiv nu s-a constatat decât hipotensiune sau tulburări semnificative de ritm; acuzele au aparut timp de 1 lună, și s-au remis progresiv după încă 1 lună în vreme ce reacția locală la injecție a fost minoră, de grad 1 și cu durata de 2 săptămâni. După 6 luni de tratament nu au mai fost înregistrate manifestări care să poată fi considerate reacții generale la administrarea imunoterapiei. Nu s-au înregistrat efecte adverse ale administrării în perfuzii i.v.

## DISCUȚII

Ideea realizării studiului a luat naștere la sfârșitul anilor '90, când adresabilitatea cazurilor de cancer colorectal în Clinica Chirurgie IV a UMF Cluj-Napoca era în creștere în timp ce resursele terapeutice rămăseseră limitate la chirurgie oncologică și protocolul de chimioterapie Fu FOL. În același timp, preparatele de vâsc care își căutau de câteva decenii locul în terapia anti-tumorală, începuseră să beneficieze de studii experimentale riguroase iar pentru studiile clinice exista deja de câțiva ani o tendință de aliniere la metodologia modernă de cercetare. Cu toate acestea, pentru localizarea colorectala a cancerului existau doar câteva studii clinice: 6 studii comparative retrospective publicate între 1979-1995 [5-10] și 2 studii comparative prospective ale aceluiași autor în 1986-'88 [11-12]. Ghidurile de buna practică în trialurile clinice (Good clinical practice-GCP) care fuseseră dezvoltate în anii '90 nu au fost aplicate în studiile asupra extractelor de vâsc până în anul 2000, probabil datorită ignoranței dar în mod sigur într-o mare măsură și dificultății de a respecta complexe cerințe ale acestor ghiduri. Studii care erau în curs au ignorat deliberat aceste ghiduri pentru a-și putea publica rezultatele, așa cum fusese prevăzut de protocolul de studiu, ceea ce a redus mult din validitatea concluziilor lor.

În aceste condiții, s-a dorit ca evaluarea acestei resurse terapeutice pe care o reprezentau extractele de *Viscum album* să respecte „gold standard”-ul conceptului de „medicină bazată pe dovezi” (Evidence-Based Medicine – EMB) și anume trialul clinic controlat și randomizat. Alegerea preparatului de vâsc s-a făcut de asemenea pe criteriile obiective reprezentate de cercetările experimentale, *in vitro* și pe animale de laborator ale unui colectiv al Universității din Zagreb care utiliza preparatul *Isorel*<sup>®</sup> [13-15]. De menționat că înafara acestui preparat mai există șapte preparate de vâsc mai importante: *abnobaVISCUM*<sup>®</sup>, *HELIXOR*<sup>®</sup>, *Iscador*<sup>®</sup>, *Iscucin*<sup>®</sup>, *Cefalektin*<sup>®</sup>, *Eurixor*<sup>®</sup> and *Lektinol*<sup>®</sup>. Toate preparatele sunt extracte de plantă totală, întregă și sunt produse prin procedee standardizate de elaborare care le asigură o constanță a compoziției; există însă diferențe între preparate în funcție de concentrațiile de lectine, viscotoxine, oligozaharide, polizaharide, rhamnogalacturonani, alcaloizi, veziculele lipidice, flavonoide etc. precum și de interacțiunile încă incomplet elucidate dintre aceste componente. Dealtfel, lectinele – principalul component prezent în extractele de vâsc, făceau obiectul unor importante studii în cadrul lectinologiei, o știință relativ nouă dar pe deplin justificată de potențialul biologic și medical al lectinelor.

Cu preparatul *Isorel*<sup>®</sup> nu mai fuseseră realizate studii clinice de anvergură însă potențialul său terapeutic reieșea din studii recente bine conduse în care se demonstrase o citotoxicitate selectivă pentru diferite linii de celule tumorale *in vitro*, efecte imunomodulatoare și de stimulare a citotoxicității limfocitelor *in vivo*, protecție față de efectele toxice ale chimioterapiei și stabilizarea ADN-ului în celulele non-tumorale precum și o inexplicabilă diferență între capacitatea de inhibiție a celulelor tumorale *in vitro* între diferite fracțiuni ale preparatului și ansamblul preparatului [13, 16-18].

Designul studiului a prevăzut un grup de Imunoterapie și unul de Control în funcție de administrarea sau nu a preparatului Isorel. Chimioterapia a fost decisă de specialiștii oncologi, inițial de la Institutul Oncologic Cluj-Napoca și apoi de departamentul oncologic propriu al clinicii, independent și orb față de alocarea în cele două grupuri. Din designul studiului s-au generat o serie de subgrupuri, în funcție de stadiul tumoral Dukes, imunoterapie și chimioterapie. Acest design a permis ulterior ca studiul să se dezvolte în condițiile progreselor făcute de chimioterapie după anul 2000. Astfel, dacă la început stadiul Dukes B nu avea indicație de chimioterapie, ulterior a urmat trialul Quasar care a fost o oportunitate pentru apariția sub-grupurilor Dukes B-imuno-chimiotratat și Dukes B-chimiotratat, pe lângă existentele Dukes B-imunotratat și Dukes B-control fără nici o terapie adjuvantă. După anul 2000, după apariția studiului lui DeGramont, regimul de 5-FU în bolus (Mayo) a fost înlocuit la unii pacienți cu protocolul de perfuzie continuă LV5FU2; cu toate avantajele acestuia ambele regimuri au fost considerate oarecum echivalente și au reprezentat o singură categorie de chimioterapie în acest studiu. Identic, pe baza ratelor de răspuns similare, cele două protocoale FOLFIRI și FOLFOX au fost considerate ca un singur tip de chimioterapie denumit FOLFIRI/FOLFOX. Imunoterapia s-a efectuat după schema descrisă, cu doze constante, considerându-se că deși preparatul este de tip antroposofic ca metodă de fabricare, nu exista argumente imunologice sau biochimice pentru o schemă de tratament antroposofică cu doze fluctuante.

Desfășurarea studiului și apariția noilor tipuri de chimioterapie sa reflectă în rezultatele intermediare publicate în 2003 și 2006 [19,20]. Ultimii pacienți au fost înrolați în 2005 astfel încât perioada de urmărire a fost de minim 5 ani. Desigur ca după 2005 s-au făcut noi progrese în chimioterapie prin apariția fluoropirimidinelor orale precum capecitabina, iar schemele de tratament s-au îmbogățit cu protocoale precum XELIRI, XELOX, XELOXIRI, capecitabina, bevacizumab etc. Probabil că studiul extractelor de vâsc va ține pasul în viitor și cu aceste noi regimuri din moment ce un studiu observational european din anul 2005 a identificat ca un procent de 15-73% (în funcție de țară) dintre pacienții cu cancer apelează la tratamente complementare, în principal naturiste, din plante, dintre care cele mai frecvent utilizate în Europa Centrală sunt preparatele de vâsc [21].

În lunga perioadă de timp a desfășurării a acestui trial au fost finalizate și publicate alte câteva studii care conțin date asupra tratamentului cu extracte de vâsc în cancerul colorectal: două trialuri controlate și randomizate [22,23], două studii comparative retrospective [24,25] și două studii de cohortă, prospective [26,27]. Toate aceste studii au utilizat alte preparate de *Viscum album* decât Isorel-ul: Iscador, Helixor, Anobaviscum. Regretabil însă, nici unul dintre studii nu realizează o stratificare a rezultatelor în funcție de noile protocoale de chimioterapie care utilizează Irinotecan sau Oxaliplatin, astfel încât datele lor folosesc doar într-o mică măsură la compararea cu rezultatele acestui studiu. Dealtfel, cu excepția unui studiu de cohortă [27], este posibil ca aceste molecule de generația a doua să nici nu fi intrat în uz la momentul la care se efectuau tratamentele imunomodulatoare analizate în aceste studii.

Datele pacienților din stadiul Dukes D arată ca cea mai bună supraviețuire este dată de asocierea imunoterapiei cu Isorel la unul din regimurile FOLFIRI sau FLFOX (mS=24 luni). Compararea cu datele de supraviețuire ale studiilor anterior menționate este dificilă.

Există 3 studii prospective care au comunicat analiza supraviețuirii (Douwes 1986 [11], Douwes 1988 [12], și Grossarth 2001 [22]), însă ultimul nu detaliază separat rezultatele în funcție de stadiile tumorale și chimioterapie.

În trialul lui Douwes se calculează supraviețuirea medie pentru stadiul metastatic de CCR tratat cu 5-FU (regimul Machover) vs. Imunoterapie (Helixor) plus 5-FU, dar raportează datele stratificat în funcție de realizarea remisiei tumorale (completă, parțială și minimă): 14 vs. 24 luni sau nu: 5 vs. 12 luni. Calculând, pe baza datelor publicate, supraviețuirea medie globală la responderi și la non-responderi împreună, se obțin durate de 10,4 vs. 21,7 luni care apar spectaculoase față de datele noastre: 8,9 vs. 14,5 luni pentru FuFol vs. Imunoterapie+FuFol.

Un studiu asemănător al aceluiași autor din 1988, cu aceleași tipuri de grupuri de tratament dar non-randomizat, găsește mediana supraviețuirii de 14 vs. 26 luni și supraviețuirea la 2 ani 60%, față de care valorile actualului studiu: 9,5 vs. 13,5 și supraviețuire maximă de 2 ani, sunt mult inferioare. Valorile raportate de Douwes par însă mai puțin credibile astăzi, când se cunoaște că au trebuit să treacă 20 de ani și să apară chimioterapicele de generația a doua pentru a obține astfel de supraviețuiri.

Există câteva studii asupra supraviețuirii pacienților în stadiul D, operați dar tratați exclusiv cu extracte de vâsc. Studiul comparativ retrospectiv a lui Hellan 1995 nu găsește diferențe semnificative de supraviețuire între tratamentele Iscador vs. Chimioterapie cu 5FU: mS fiind 330 vs. 371 zile; aceste valori se înscriu însă în plaja de valori constatate de actualul studiu pentru grupurile Fu-Fol și Imunoterapie + Fu-Fol. Din seria studiilor retrospective, vechi și cu inconsistențe metodologice se mai pot extrage alte câteva date: supraviețuire la 5 ani 10%-20% [8,25], supraviețuire medie și mediană 17,3 și 17 luni [7]. Aceste date nu mai prezintă interes astăzi când progresele remarcabile ale chimioterapiei exclud utilizarea Imunoterapiei ca unic tratament. Acesta este și motivul pentru care sub-grupul de tratament doar cu imunoterapie (n=2), rezultat din designul studiului în urma unor contraindicații pentru chimioterapie, a fost ignorat din analiza supraviețuirii stratificate. Dealtfel, constituirea deliberată a unui asemenea sub-grup nu ar respecta normele de etica cercetării științifice.

Intrucât raportarea studiului actual la studiile cu extracte de vâsc existente în literatură nu este relevantă, o imagine asupra eficienței imunoterapiei se poate contura prin comparație cu terapiile oncologice care asigură cele mai mari mediane ale supraviețuirii la ora actuală: Trialul GONO (FOLFOXFIRI 22,6 luni VS. FOLFOX 16,7 luni) [28], Trialul AIO (CAPOX 17 luni vs. FUFOX 19 luni) [29], trialul SGO (XELOX 18 luni vs. FUOX 21 luni) [30], IFL 15,6 luni vs. IFL+bevacizumab 20 luni [31], bevacizumab+XELOX/FOLFOX 21,3 luni [32], trialul PRIME (FOLFOX4 19,7 luni vs. FOLFOX4+panitumumab 23,9 luni) [33]. Se constată că, în timp ce sub-grupurile Fu-Fol și FOLFIRI/FOLFOX realizează supraviețuiri conforme cu cele citate în literatură, mS: 9,5 și respectiv 18 luni (confirmându-se astfel și validitatea studiului), sub-grupul în care se adaugă imunoterapia la Fu-Fol înregistrează creșteri ale supraviețuirii care tind spre nivelurile obținute de combinațiile de noi agenți citostatici (irinotecan, oxaliplatin, capecitabina etc), iar sub-grupul la care se adaugă imunoterapia la acești noi agenți realizează supraviețuiri care se apropie de cele obținute prin adăugarea de agenți de terapie moleculară țintită (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) la noii agenți menționați.

La fel ca și în cazul stadiului Dukes D, pentru stadiul Dukes C cea mai bună supraviețuire este dată de asocierea imunoterapiei cu Isorel la unul din regimurile FOLFIRI sau FLFOX (mS=57,5 luni, supraviețuire la 5 ani 65%).

Studiile existente în literatură raportează în anii '80 supraviețuiri la 5 ani de 11-37% utilizând preparate precum Iscador sau Helixor ca unic tratament adjuvant postoperator. Studii din anii '90 compară diferite extracte de vâsc cu chimioterapia, găsind supraviețuiri mediane de 47 vs. 31 luni [9] sau 1251 vs. 950 zile [10]. Protocoalele actuale de chimioterapie FU-FOL Mayo, LV5FU2, FOLFOX, FOLFIRI, Capecitabina, realizează supraviețuiri la 5 ani între 60 și 75% [34-37], față de care valorile sub-grupurilor Fu-Fol și FOLFIRI/FOLFOX ale acestui studiu sunt mult inferioare (17% și 40%). Cauza o reprezintă probabil numărul relativ mare de cazuri stadializate Dukes C dar care conform clasificării TNM (AJCC2010) ar corespunde stadiului IIIC. Diferențele de supraviețuire la 5 ani de la momentul diagnosticului pentru sub-categoriile stadiului III TNM (83 vs. 64 vs. 44 pentru IIIA vs. IIIB vs. IIIC) au fost demonstrate în literatură în 2002 [38]. O analiză viitoare va putea elucida acest aspect, însă obiectivul studiului actual, de evaluare a eficienței imunoterapiei a fost atins: supraviețuirea la 5 ani de 64% pentru Imunoterapie +FOLFIRI/FOLFOX este semnificativ crescută față de cea a subgrupurilor de control (40%). Pe de altă parte, supraviețuirea la 5 ani nu este cel mai fidel parametru de evaluare a eficienței tratamentelor adjuvante, fiind de preferat pentru viitoarele analize ale stadiului III (TNM) supraviețuirea liberă de boală.

Reacțiile adverse locale ale injectării extractului de vâsc au fost cuantificate în 4 grade după o scală proprie întrucât nu s-a găsit un echivalent în criteriile de toxicitate CTC. Frecvența acestora (83%) este mai mare decât în studiile anterioare: 23,3% din 429 pacienți tratați cu Iscador (Friedel 2007), 40% din 25 de pacienți tratați cu anobaViscum® (Bar sela). Diferențele provin din modul diferit de cuantificare a existenței/gravității lor și nu prezintă o importanță deosebită întrucât reacțiile locale ușoare sau moderate și autolimitate în timp sunt binecunoscute și acceptate ca făcând parte din modul de acțiune al preparatului. Cele patru cazuri de gradul 4 au prezentat tumefacție inflamatorie a întregului braț extinsă la antebraț și mână, la 2 cazuri fiind prezentă reacție de gradul 3 și la brațul contralateral. Au fost tratate cu comprese reci și s-au utilizat restul ariilor de injectare de la coapse unde reacția a fost de gradul 1-2, evitându-se astfel întreruperea tratamentului. După 2 luni de la începutul imunoterapiei nu au mai apărut reacții locale, nici măcar de gradul 1.

Efectele sistemice ale administrării sunt citate în literatura în procente de 2,3-8%. Cazul descris în acest studiu este atipic față de efectele adverse descrise de alți autori. La administrarea în perfuzii a extractului nu s-au înregistrat efecte adverse. Efectele de reducere a toxicității chimioterapiei nu au fost evaluate în acest studiu.

## CONCLUZII

Adăugarea imunoterapiei cu extractul de *Viscum album* Isorel® la protocoalele moderne de chimioterapie realizează creșteri semnificative ale supraviețuirii pacienților cu cancer colorectal avansat.

## BIBLIOGRAFIE

1. Kienle GS, Kiene H. Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. *Eur J Med Res.* 2007; 12(3): 103-119.
2. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (2): CD003297.
3. Kienle GS, Glockmann A, Schink M, Kiene H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28: 79.



4. Ostermann T, Raak C, Bussing A. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer*. 2009; 9(1): 451.
5. Salzer G. 30 Jahre Erfahrung mit der Misteltherapie an öffentlichen Krankenanstalten. In: Leroi R. ed. *Misteltherapie. Eine Antwort auf die Herausforderung Krebs*. Stuttgart. Verlag Freies Geistesleben, 1987; p. 173-215.
6. Boie D, Gutsch J. Helixor bei Kolon- und Rektumkarzinom. In: Denck H and Karrer K. ed. *Kolo-rektale Tumoren*. Verlag für Medizin, vol. 23. 1980; p. 65-76.
7. Leroi R. Klinische Erfahrungen mit dem Mistelpräparat Iscador®. In: Wolff O. ed. *Die Mistel in der Krebsbehandlung*. Frankfurt am Main, Vittorio Klostermann GmbH, 1985; p. 71-110.
8. Hoffmann J, Hajto T. Die Iscador®-Behandlung der kolorektalen tumoren. *Krebsgeschehen* 1984; 16: 150-153.
9. Salzer G, Hellan J, Danmayr E, Wutzlhofer F, Arbeiter K. Das operierte kolorektale Karzinom - Eine retrospektive Therapieanalyse. *Onkologie* 1992; 24: 103-107.
10. Hellan J, Danmayr E, Hellan M. Stellenwert der Komplementärmedizin in der Behandlung onkologischer Patienten - dargestellt anhand des kolo-rektalen Karzinoms. *Dtsch Zschr Onkol* 1995; 27, 85-94.
11. Douwes FR, Wolfrum DI, Migeod F. Ergebnisse einer prospektiv randomisierten Studie: Chemotherapie versus Chemotherapie plus "Biological Response Modifier" bei metastasierendem kolorektalen Karzinom. *Krebsgeschehen* 1986; 18: 155-163.
12. Douwes FR, M. Kalden M, Frank G, Holzhauer P. Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Zschr Onkol* 1988; 20: 63-67.
13. 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.
14. Zarkovic N, Zarkovic K, Grainca S, Kissel D, Jurin M. The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumor-host relationship. *Anti-Cancer Drugs*. 1997, 8(1): S17-S22.
15. Jurin M, Zarkovic N, Borovic S, Kissel D. *Viscum album L.* preparation Isorel modifies the immune response in normal and in tumour-bearing mice. *Anti-Cancer Drugs*. 1997; 8(Suppl. 1): S27-S31.
16. Jung ML, Baudino S, Ribereau-Gayon G, Beck JP. Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album L.*). *Cancer Lett* 1990; 51: 103-114.
17. Kissel D, Jurin M, Zarkovic N. Über die zytostatischen und immunologischen effekte von *Viscum album*. *Erfahrungswissenschaften* 1990; 39: 59-63.
18. Zarkovic N, Trbojevic M, Ilic Z, Grainca S, Jurin M. Comparison of the effects of high and low concentrations of the separated *Viscum album L.* lectins and of the plain mistletoe plant preparation (Isorel) on the growth of normal and tumor cells in vitro. *Periodicum Biologorum* 1995; 97: 61-67.
19. Cazacu M, Oniu T, Lungoci C, Mihailov A, Cipak A, Klinger R, et al. The influence of Isorel on the advanced colorectal cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2003; 18(1): 27-34
20. Oniu T, Cazacu M, Rednic N, Mihailov A, Man M. Survival analysis of advanced colorectal cancer patients treated with mistletoe extract. *Radioterapie & Oncologie Medicală* 2006, 3: 187-198.
21. Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, Ozden G, Scott JA, Panteli V, Margulies A, Browall M, Magri M, Selvekerova S, Madsen E, Milovics L, Bruyns I, Gudmundsdottir G, Hummerston S, Ahmad AM, Platin N, Kearney N, Patiraki E. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Ann Oncol*. 2005; 16: 655-663.
22. Grossarth-Maticek R, Kiene H, Baumgartner S, Ziegler R. Use of Iscador®, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. *Altern Ther Health Med* 2001; 7: 57-78.
23. Schink M, Tröger W, Dabidian A, Goyert A, Scheuerecker H, Meyer J, Fischer IU, Glaser F. Mistletoe extract reduces the surgical suppression of natural killer cell activity in cancer patients. A randomized phase III trial. *Forsch Komplementärmed* 2007; 14: 9-17.
24. Friedel E, Matthes H, Bock P. Treatment with standardized mistletoe extract (*Viscum album L.*) Iscador® as a part of long-term supportive care in patients with primary non-metastatic colorectal carcinoma. *Z Gastroenterol* 2007; 45.

25. Stumpf C, Rieger S, Fischer IU, Schietzel M. Retrospektive Untersuchung zur Therapie mit Mistelextrakten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. *Dtsch Zschr Onkol* 2007; 39: 12-22.
26. Mansky PJ, Wallerstedt DB, Monahan BP, Lee C, Sannes T, Stagl J, et al. Phase I study of mistletoe extract/gemcitabine combination treatment in patients with advanced solid tumors. *Onkologie* 2008, 31: 200.
27. Bar-Sela G, Haim N. Abnoba-viscum (mistletoe extract) in metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil and leucovorin-based chemotherapy. *Med Oncol* 2004; 21: 251-254.
28. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 1670–1676.
29. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 2007; 25(27): 4217-4223.
30. Díaz-Rubio E, Tabernero J, Gómez-España A, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol* 2007; 25(27): 4224-4230.
31. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2335-2342.
32. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al.: Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26(12): 2013-2019.
33. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28(31): 4697-4705.
34. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351.
35. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3456-3461.
36. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3117-3125.
37. Ychou M, Raoul JL, Douillard JY, Gourgou-Bourgade S, Bugat R, Mineur L, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol* 2009; 20: 674-680.
38. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY: Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-1425.