

## Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα για την οξεία νόσο του μοσχεύματος κατά ξενιστή

Αναστασία Παπαδοπούλου, Ιωάννης Μπάτσος

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η οξεία νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή (aGvHD) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT). Η δυνατότητα των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (MSCs) να ασκούν ισχυρή ανοσορρυθμιστική δράση, έχει εγείρει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση τους στην αντιμετώπιση της aGvHD μετά από HSCT. Ένας αξιολόγος αριθμός προ-κλινικών και κλινικών μελετών φάσης I-II φανερώνουν ότι η χορήγηση MSCs είναι ασφαλής και εν δυνάμει αποτελεσματική στην πρόληψη ή/και τη θεραπεία της aGvHD. Ωστόσο, η χρήση τους εξακολουθεί να υπόκειται σε περιορισμούς ενώ απαιτούνται ισχυρότερα δεδομένα της αποτελεσματικότητάς τους. Στην παρούσα ανασκόπηση παραθέτουμε τα δημοσιευμένα αποτελέσματα χορήγησης MSCs σε πειραματικά ζωικά μοντέλα αλλογενούς HSCT και κλινικών μελετών χορήγησης MSCs ως μέσο πρόληψης ή θεραπείας της aGvHD. Τα δεδομένα αυτά τονίζουν τη σημαντικότητα της θεραπευτικής στρατηγικής με MSCs στο πλαίσιο αλλογενούς HSCT ωστόσο υποδηλώνουν ότι απαιτούνται πρόσθετες, πολυκεντρικές, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες ώστε να διασαφηνιστεί η αποτελεσματικότητα χορήγησης MSCs στον έλεγχο της aGvHD.

Haema 2016; 7(1): 6-17 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation – HSCT) αποτελεί σήμερα τη μόνη θεραπευτική επιλογή με δυνατότητα ίασης σε πληθώρα νεοπλασματικών ή μη παθήσεων. Βασίζεται στην εκρίζωση του παθολογικού κλώνου από το συνδυασμό χημειο/ακτινοθεραπείας που προηγείται (προπαρασκευαστικό σχήμα) της έγχυσης μοσχεύματος και κυρίως τη δράση του αλλογενούς μοσχεύματος έναντι του κλώνου<sup>1,2</sup>. Ωστόσο, τα T-λεμφοκύτταρα του μοσχεύματος επάγουν τη νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft versus Host Disease – GvHD), μία σοβαρή φλεγμονώδη κατάσταση ως συνέπεια της ανοσολογικής αντίδρασης των T-λεμφοκυττάρων του δότη έναντι ιστών του λήπτη, η οποία αποτελεί τη σοβαρότερη και συχνά θανατηφόρα επιπλοκή της αλλογενούς HSCT<sup>3</sup>. Εάν δεν υπάρξει παρέμβαση πριν και μετά την αλλογενή HSCT, σχεδόν όλοι οι λήπτες θα αναπτύξουν σοβαρή GvHD.

Παρ' ότι η χρήση ανοσοκατασταλτικών βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με GvHD, ορισμένες περιπτώσεις σοβαρής νόσου δεν απαντούν σε υψηλές δόσεις στεροειδών. Η κλινική έκβαση αυτών των ασθενών είναι φτωχή, με υψηλά ποσοστά θνητότητας λόγω λοιμώξεων και παρατεταμένης, σχετιζόμενης με GvHD, κυτταροπενίας και ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων<sup>4</sup>. Από την άλλη πλευρά, η αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από το μόσχευμα μπορεί να μειώσει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα της GvHD, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε απόρριψη του μοσχεύματος<sup>5</sup>, υποτροπή της νόσου<sup>6</sup> και σοβαρές λοιμώξεις<sup>7</sup>. Συνεπώς, ο στόχος της HSCT είναι η ρύθμιση της αλλοαντιδραστικότητας με τη χορήγηση αλλογενών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία δεν θα επάγουν GvHD, αλλά θα διατηρούν τη δράση έναντι των λευχαιμικών κυττάρων (graft vs leukemia) και έναντι των λοιμώξεων (graft vs infection).

Τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal Stromal Cells – MSCs) είναι ένας πολυδύναμος πληθυσμός προγονικών κυττάρων που εδράζονται στον μυελό των οστών, καθώς και σε άλλους ιστούς, και έχουν ως βασικό ρόλο τη ρύθμιση της αιμοποίησης<sup>8</sup>. Μπορούν να απομονωθούν εύκολα, χάρη στην ικανότητά τους να προ-

---

Αιματολογική Κλινική-ΜΜΜΟ, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Γενικό Νοσοκομείο «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ιωάννης Μπάτσος, e-mail: iobats@yahoo.gr

σκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες και να εκπτυχθούν αποτελεσματικά, αποδίδοντας γρήγορα υψηλούς αριθμούς. Οι αναγνωρισμένες δυνατότητές τους να μπορούν να διαφοροποιούνται προς ένα ευρύ φάσμα κυττάρων<sup>9</sup> και να ξεπερνούν τους φραγμούς του συστήματος ιστοσυμβατότητας έχουν εγείρει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην ιστική αναγέννηση και ιστική μηχανική, στη γονιδιακή θεραπεία ως οχήματα γονιδιακής μεταφοράς και στη μεταμόσχευση μυελού οστών ως υποστηρικτικά κύτταρα για την εμφύτευση των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων. Επιπρόσθετα, η ανακάλυψη της ανοσορρυθμιστικής τους δράσης<sup>10-13</sup> τα καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στον έλεγχο της GvHD μετά από αλλογενή HSCT. Στην ανασκόπηση που ακολουθεί, παρουσιάζεται η προκλινική και κλινική έρευνα των τελευταίων χρόνων στην αντιμετώπιση της οξείας GvHD (aGvHD) με MSCs και αναπτύσσονται προβληματισμοί και εκτιμήσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν την επίσημη ένταξη των MSCs στα θεραπευτικά πρωτόκολλα των μεταμοσχευτικών κέντρων.

### Προ-κλινικά ευρήματα χρήσης των MSCs ως θεραπεία της aGvHD

Η *in vitro* ανοσορρυθμιστική δράση των MSCs πρωτοαναφέρθηκε στις αρχές του 2000<sup>14</sup> και πλέον θεωρείται αναμφισβήτητη. Η ιδιότητά τους αυτή οδήγησε πολλές επιστημονικές ομάδες στη διερεύνηση της χρήσης τους ως πρόληψη ή/και θεραπεία της aGvHD σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα (Πίνακας 1). Παρά τη γενική ομοφωνία περί της ανοσορρυθμιστικής *in vitro* δράσης των MSCs, τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών παραμένουν διφορούμενα. Το 2004 ανακοινώθηκε ότι η συγχωρήγηση MSCs ταυτόχρονα με το μόσχευμα σε ζωικό πειραματικό μοντέλο μυών μπορεί να αποτρέψει την GvHD και άνοιξε το δρόμο για την κλινική τους χρήση<sup>15</sup>. Πολύ σύντομα όμως, άλλη μελέτη ανέφερε ότι τα MSCs ανέστειλαν με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων με αλλοαντιγόνο T-λεμφοκυττάρων *in vitro*, ωστόσο, δεν επηρέασαν την εξέλιξη της aGvHD όταν χορηγήθηκαν σε διάφορες δόσεις ταυτόχρονα με το αιμοποιητικό μόσχευμα, υποδηλώνοντας αναποτελεσματικότητα στην πρόληψη της νόσου<sup>16</sup>. Την ίδια χρονιά, οι Yañez et al παρατήρησαν θεραπευτικό όφελος μετά από έγχυση τριών εβδομαδιαίων δόσεων MSCs προερχόμενων από λιπώδη ιστό, ξεκινώντας από την ημέρα της μεταμόσχευσης. Κανένα όφελος δεν επετεύχθη όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν σε εγκατεστημένη νόσο οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πρόληψη της aGvHD με MSCs είναι ευκολότερη της θεραπείας<sup>17</sup>. Ένα χρόνο αργότερα, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τους Tisato et al με MSCs ομφάλιου λώρου. Οι τελευταίοι παρατήρησαν κλινικό όφελος στην aGvHD μετά από πολλαπλές

εγχύσεις MSCs πριν την HSCT με εβδομαδιαία μεσοδιαστήματα και καμία βελτίωση της νόσου όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν εφάπαξ ή με την έναρξη της GvHD<sup>18</sup>. Αναμφίβολα, τα αποτελέσματα των προ-κλινικών μελετών φανερώνουν ότι παράγοντες όπως ο χρόνος έγχυσης των κυττάρων, η δόση και η πηγή προέλευσής τους είναι καθοριστικοί για την αποτελεσματικότητα των κυττάρων έναντι της νόσου και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν μεταφραστούν κλινικά.

A) *Προσδιορίζοντας τη βέλτιστη δόση MSCs*: Δεδομένου ότι ο αριθμός των διαθέσιμων για χορήγηση MSCs μπορεί να είναι περιορισμένος, αρχικά θα πρέπει να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση για τη θεραπεία της GvHD. Πολλές μελέτες κάνουν λόγο για δόσο-εξαρτώμενη δράση των MSCs (Πίνακας 1). Χαρακτηριστικά οι Joo et al χρησιμοποιώντας μικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες προσδιόρισαν την αναλογία 0.5 MSCs: 1 σπληνοκύτταρα ως τη βέλτιστη αναλογία αναστολής του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων *in vitro*. Στη συνέχεια προσπαθώντας να προσομοιώσουν τις *in vitro* συνθήκες *in vivo* σε μοντέλο aGvHD μυών που έλαβαν  $5 \times 10^6$  κύτταρα μυελού και  $1 \times 10^6$  σπληνοκύτταρα, χορήγησαν χαμηλή ( $0.5 \times 10^6$ ), ενδιάμεση ( $1 \times 10^6$ ) ή υψηλή ( $2 \times 10^6$ ) δόση MSCs. Μόνο η ενδιάμεση και η υψηλή δόση MSCs βελτίωσαν σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ζώων<sup>19</sup>, υποδηλώνοντας ότι υψηλές δόσεις MSCs θα απαιτηθούν για κλινική χρήση στην aGvHD.

B) *Προσδιορίζοντας τον βέλτιστο χρόνο έγχυσης των MSCs*: Αρκετές επιστημονικές ομάδες διερεύνησαν τον βέλτιστο χρόνο χορήγησης MSCs στη θεραπεία της aGvHD (Πίνακας 1). Αξιοσημείωτα, οι Polchert et al μελέτησαν τη δράση των MSCs σε μοντέλο BALB/c χορηγώντας τα σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την HSCT (ημέρα +0 ή +2 ή +20 ή +30). Κανένα κλινικό όφελος δεν παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν την ημέρα 0 ή σε βαριά νόσο (ημέρα +30). Η ομάδα απέδωσε την παρατηρούμενη από άλλες επιστημονικές ομάδες αναποτελεσματικότητα των MSCs να θεραπεύσουν την aGvHD στο μικροπεριβάλλον και συγκεκριμένα στην απουσία προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως της IFN- $\gamma$ , τη στιγμή χορήγησής τους. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, τα MSCs αύξησαν το ποσοστό επιβίωσης των μυών μόνο εφόσον χορηγήθηκαν μετά την αναγνώριση του αντιγόνου από τα T-λεμφοκύτταρα, όταν δηλαδή τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  ήταν αρκετά υψηλά (ημέρες +2 ή +20 μετά την HSCT). Ακόμη και μία έγχυση ήταν αρκετή όταν πραγματοποιούνταν την κατάλληλη χρονική στιγμή<sup>20</sup>. Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι η έκθεση των MSCs σε IFN- $\gamma$  πριν τη χορήγησή τους μπορεί να προστατεύσει πλήρως τα ζώα από τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα, υπογραμμίζοντας ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να ενισχύσουν την εν δυνάμει θεραπευτική δράση των MSCs. Πληθώρα αναφορών ενισχύει τα δεδομένα ότι οι ανοσο-

**Πίνακας 1. Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.**

Βιολογιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
<i>Μελέτες που καταδεικνύουν αποτελεσματικότητα των MSCs στην GvHD</i>							
Chenet al. <sup>50</sup>	BALB/c	C57BL/6	Εμπορικά διαθέσιμα C57BL/6 MSCs	iv	2x10 <sup>5</sup>	D+1,7	Η χορήγηση MSCs μείωσε τη θνητότητα και άμβλυνε τις αλλοιώσεις που προκαλεί η GvHD σε διάφορους ιστούς. Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των γενετικά τροποποιημένων MSCs (CXCR4+).
Chung et al. <sup>15</sup>	BALB/c	C3H/he	BM δότη	iv	1x10 <sup>5</sup>	D+0	Πρόληψη της GvHD από χορήγηση MSCs κατά τη μεταμόσχευση.
Gao et al. <sup>51</sup>	BALB/c	C57BL/6	MSCs δέρματος από τον δότη	iv	2x10 <sup>6</sup>	D+0	Μη καλλιεργημένα MSCs δέρματος μείωσαν τη συχνότητα εμφάνισης και σοβαρότητα της aGvHD σε μοντέλο σύμβατης μεταμόσχευσης.
Gregoire-Gauthier et al. <sup>52</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	MSCs σφράγιου λώρου ανθρώπου	iv	1x10 <sup>6</sup>	D+0	Μία εφάπαξ έγχυση MSCs μπορεί να αναστείλει τα κλινικά συμπτώματα και τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα.
Jang et al. <sup>53</sup>	BALB/c	C57BL/6	MSCs ανθρώπινου πλάκουντα	iv	5x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0	Αποτελεσματικότητα της υψηλής δόσης MSCs πλακούντα στον έλεγχο της aGvHD σε ζωικό μοντέλο μη συμβατούς μεταμόσχευσης.
Jang et al. <sup>54</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	UCB ανθρώπου	iv	5x10 <sup>5</sup>	D+0, D+0,3,6, D+0,7,14, D+18, D+18,21,24, D+18,25,32	Ως πρόληψη, μόνο οι πολλαπλές εγχύσεις MSCs βελτίωσαν την επιβίωση των ζώων σε μοντέλο ξενομεταμόσχευσης. Ως θεραπεία, τόσο η εφάπαξ όσο και οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις αύξησαν τα ποσοστά επιβίωσης και μετράσαν τις αλλοιώσεις στους ιστούς-στόχους της GvHD. Προσδιορισμός του βέλτιστου χρόνου χορήγησης MSCs για την πρόληψη και την θεραπεία της GvHD.
Jo et al. <sup>19</sup>	BALB/c	C3H/he	BM δότη	iv	5x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+0 και D+0	Δοσο-εξαρτώμενη δράση των MSCs και αποτελεσματικότητα τους σε υψηλές δόσεις.
Li et al. <sup>55</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη	iv	2x10 <sup>4</sup> , 2x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+3	Σημαντική και δοσο-εξαρτώμενη καθυστέρηση της εξέλιξης της GvHD από τα MSCs.
Li et al. <sup>56</sup>	BALB/c	σφράγια C57/BL	BM δότη	iv	2x10 <sup>7</sup>	D+0	Χαμηλότερο σκορ aGvHD και καλύτερα ποσοστά επιβίωσης ζώων που έλαβαν MSCs ταυτόχρονα με το ομφαλοπλακουντιακό μόσχευμα.

UCB, αίμα σφράγιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά κίτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοφλέβια; ip, ενδοπεριτοναϊκά; D+, ημέρα.

**Πίνακας 1.** (συνέχεια) Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.

Βιβλιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
Nevruz et al <sup>57</sup> .	Wistar επίμυς	Sprague Dawley επίμυς	BM δότη		2x10 <sup>6</sup> /kg	D+1 και με τα πρώτα κλινικά συμπτώματα GvHD	Η χορήγηση MSCs προφυλακτικά ή ως θεραπεία με την εμφάνιση των πρώτων κλινικών συμπτωμάτων της GvHD αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητα επίμυς μετά από αλλογενή μεταμόσχευση. Τα MSCs ήταν εξίσου αποτελεσματικά με το πάγιο προφυλακτικό σχήμα στην αποφυγή της GvHD.
Polchert et al <sup>20</sup>	C57BL/6	BALB/c	BM δότη	iv	1x10 <sup>5</sup> και 5x10 <sup>5</sup>	D+0, D+2, D+20 και D+30	Αναποτελεσματικότητα των MSCs όταν εγχύθηκαν την D+0 ή σε βαριά νόσο D+30 λόγω ανεπαρκούς IFN-γ. Σημαντική βελτίωση της θνησιμότητας με χορήγηση των κυττάρων σε υπό εξέλιξη νόσο, D+2 και D+20.
Ren et al <sup>23</sup>	C57BL/6 x C3H	C57BL/6	BM δότη	iv	0.5x10 <sup>6</sup>	D+3,7	Η χορήγηση MSCs απέτρεψε την GvHD. Η δράση των MSCs εξαρτάται από την παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.
Tisato et al. <sup>18</sup>	NOD/SCID	PBMC ανθρώπου	UCB ανθρώπου	iv	3x10 <sup>6</sup>	D-5,-4,-3,-2,-1	Μία εφάπαξ δόση MSCs δεν ήταν αποτελεσματική στη θεραπεία της GvHD. Βελτίωση της νόσου όταν τα MSCs χορηγήθηκαν με εβδομαδιαία μεσοδιαστήματα. Μη παρατηρήθέν όφελος από την χορήγηση MSCs κατά την έναρξη της νόσου.
Tobinet al. <sup>30</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	BM ανθρώπου	iv	4.4x10 <sup>4</sup> /g	D+0 και D+7	Ο χρόνος έναρξης των MSCs καθορίζει την αποτελεσματικότητά τους. Κλινικό όφελος μόνο όταν τα MSCs χορηγήθηκαν την D+7 και όχι την D+0, εκτός αν ήταν διεγερμένα με IFN-γ.
Xishanet al. <sup>58</sup>	C57BL/6	-	BM BALB/c	iv	1x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0	Δοσο-εξαρτώμενη αποτελεσματικότητα των MSCs στην aGvHD.
Yañez et al <sup>17</sup>	B6D2F1	C57BL/6	Λιπώδης ιστός	iv	5x10 <sup>4</sup>	D+0,7,14 ή D+14,21,28	Κλινικό όφελος μετά από πολλαπλές εγχύσεις MSCs με έναρξη την D+0. Μη παρατηρήθέν όφελος με έναρξη των εγχύσεων μετά τη σταθεροποίηση της GvHD.
Yoo et al <sup>33</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM ανθρώπου ή BM μυών C3H/HeN	iv	5x10 <sup>5</sup>	D+1, 3	Πολλαπλές εγχύσεις MSCs μυών ή ανθρώπου βελτιώνουν σημαντικά τη σοβαρότητα της GvHD. Το πρωτοκόλλο απομόνωσης των MSCs επηρεάζει την ανοσο-ρυθμιστική τους δράση.
<b>Μελέτες που καταδεικνύουν αναποτελεσματικότητα των MSCs στην GvHD</b>							
Badillo et al <sup>59</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη	iv	5x10 <sup>4</sup> , 1x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0, D+2, D+0,7,14, D+10 και D+21	Αναποτελεσματικότητα των MSCs, μετά από χορήγηση σε διάφορες δόσεις και χρονικές στιγμές, τόσο στην πρόληψη όσο και τη θεραπεία της GvHD.

UCB, αίμα ομφάλιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά κύτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοφλέβια; ip, ενδοπεριτοναϊκή; D+, ημέρα.

**Πίνακας 1.** (συνέχεια) Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.

Βιβλιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
Bruck et al <sup>60</sup>	NSG	PBMCs ανθρώπου	BM ανθρώπου	ip ή iv	2x10 <sup>6</sup> και 3x10 <sup>6</sup>	D+0, D+0, 7, 14 και D+0, 7, 14, 21	Η χορήγηση MSCs δεν προσέφερε κλινικό όφελος στην πρόληψη της GvHD σε δύο εξανθρωπισμένα μοντέλα ξενομεταμόσχευσης.
Jeon et al <sup>62</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM ανθρώπου	iv	1x10 <sup>6</sup>	D+0 και D+7	Μία έγχυση MSCs ανθρώπου δεν ήταν αρκετή να μειώσει τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα μυών σε μόντελο αλλογενούς μεταμόσχευσης.
Min et al <sup>61</sup>	B6D2F1	C57BL/6	BM και MSCs δότη	iv	1x10 <sup>6</sup> , 2x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+1, D+1, 3, 5 και D+1	Μη μετριασμός της σοβαρότητας της GvHD μετά από πρώιμη χορήγηση διαφόρων δόσεων MSCs.
Prigozhina et al <sup>63</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη και δέκτη	iv	5x10 <sup>4</sup> και 5x10 <sup>5</sup>	D+0, 7, 14	Αδυναμία των MSCs να ελέγξουν την GvHD λόγω έλλειψης της ανοσορυθμιστικής τους δράσης σε ασύμβατες μεταμοσχεύσεις.
Sudres et al <sup>16</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM δότη	iv	5x10 <sup>5</sup> , 3x10 <sup>6</sup> και 4x10 <sup>6</sup>	D+0	Κανένα παρατηρηθέν όφελος στη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα της GvHD, παρά την ανίχνευση των MSCs στον λήπτη.

UCB, αίμα ομφάλιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοπεριτοναικά; D+, ημέρα.

ρυθμιστικές ιδιότητες των MSCs δεν είναι έμφυτες, αλλά πιθανότατα ενεργοποιούνται από κυτοκίνες και άλλους παράγοντες του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος<sup>21-28</sup>. Η παραδοχή ότι τα MSCs πρέπει να «αδειοδοτηθούν» από το μικροπεριβάλλον για να δράσουν ανοσορυθμιστικά, καθιστά σαφές ότι ο χρόνος χορήγησης τους είναι μία πρόσθετη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στην κλινική εφαρμογή τους<sup>18,29,30</sup>. Επιπρόσθετα, εκτός από την ενεργοποίηση της ανοσορυθμιστικής δράσης των MSCs, το φλεγμονώδες περιβάλλον αποτελεί πόλο έλξης τους<sup>31</sup>. Με την προσέλευσή τους λοιπόν σε ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη, τους δίνεται η δυνατότητα να ασκήσουν τη δεύτερη σημαντική τους δράση, τη συμμετοχή τους στην αναγέννηση των υπό βλάβη ιστών, μέσω έκκρισης παραγόντων, μεταδιαφοροποίησης και κυτταρικής σύντηξης. Σε μία μελέτη βιοαπεικόνισης με στόχο την παρακολούθηση της μετανάστευσης των κυττάρων, σπληνοκύτταρα σημασμένα με την φθορίζουσα EGFP χρωστική, χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή GvHD σε ζώα, τα οποία στη συνέχεια έλαβαν MSCs σημασμένα με την RFP χρωστική. Με ανίχνευση των χρωστικών βρέθηκε ότι τα σπληνοκύτταρα μετανάστευσαν αρχικά στους πνεύμονες και ακόλουθα στο γαστρεντερικό σύστημα, το ήπαρ, το δέρμα και τους λεμφαδένες, ιστούς-στόχους της aGvHD. Μετά την έγχυση MSCs, η RFP χρωστική εντοπίστηκε στα ίδια σημεία, αποδεικνύοντας ότι τα MSCs μπορούν να μεταναστεύσουν στους ιστούς που πλήττονται από aGvHD και εν δυνάμει να συμμετέχουν στην ιστική αναγέννηση μέσω κυτταρικής επαφής αλλά και παρακρινούς δράσης.

Το πόσο καθοριστικοί μπορεί να είναι οι παράγοντες, δόση και χρόνος χορήγησης των κυττάρων, γίνεται επίσης φανερό από το γεγονός ότι μία επιστημονική ομάδα που αρχικά δημοσίευσε αναποτελεσματικότητα των MSCs σε ζωικό μοντέλο GvHD<sup>32</sup>, ανέφερε αργότερα αποτελεσματικότητα των κυττάρων στο ίδιο ζωικό μοντέλο μετά από χορήγηση πολλαπλών δόσεων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές<sup>33</sup>.

### Κλινική χρήση των MSCs στη θεραπεία της aGvHD

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο σημαντικότερος περιορισμός στην επιτυχή έκβαση της αλλογενούς μεταμόσχευσης είναι η εκδήλωση της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή. Η πρώτη γραμμή θεραπείας της aGvHD είναι η χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοειδών, αλλά μόνο το 50% των ασθενών θα ανταποκριθούν<sup>34</sup>. Δεν υπάρχει καθιερωμένη δεύτερη γραμμή θεραπείας για ασθενείς με ανθεκτική

**Πίνακας 2. Κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.**

Βιβλιογραφία	Φάση μελέτης	Ασθενείς	Βαθμός (grade)	Πηγή MSCs	Αποτελέσματα	Σχόλια
LeBlanc et al <sup>37</sup>	I	1	IV	BM	ΠΥ (100%)	Πιλοτική μελέτη θεραπείας ανθεκτικού σε στεροειδή GvHD με MSCs τρίτου χώρου.
Lazarus et al <sup>63</sup>	I	46	Προφύλαξη	BM	13 εμφανίσεις aGvHD (28%)	Η συγχορήγηση εκτυποσόμενων MSCs από συμβατό δότη ως πρόληψη της GvHD είναι ασφαλής και εφικτή.
Ringden et al <sup>38</sup>	I	8	III-IV	BM	6 ΠΥ (75%)	Ανίχνευση των MSCs του δότη σε παχύ έντερο και λεμφαδένια ασθενούς. Βελτίωση του συνολικού ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα αναφοράς.
LeBlanc et al <sup>39</sup>	II	55	II-IV	BM	30 ΠΥ (54%), 9 ΜΥ (16%)	Μικρότερη σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση θνητότητα και υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης 2-ετών στους ασθενείς με ΠΥ. Καλύτερη απάντηση παιδιατρικών ασθενών.
Fang et al <sup>64</sup>	I	6	III-IV	Λιπώδης ιστός	5 ΠΥ (83%)	Διερεύνηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας MSCs προερχόμενων από λιπώδη ιστό ως θεραπεία διάσωσης του ανθεκτικού aGvHD.
Muller et al <sup>65</sup>	I	2	III-IV	BM	1 ΠΥ (50%)	Η πρώτη μελέτη χρήσης MSCs σε παιδιατρικούς ασθενείς.
Ning et al <sup>48</sup>	I	10	Προφύλαξη	BM	1 ανάπτυξη	Η συγχορήγηση η MSCs κατά την HSCT απέτρεψε την ανάπτυξη GvHD, αν και αύξησε το ποσοστό υποτροπής σε σύγκριση με την ομάδα αναφοράς.
Kebrl et al <sup>43</sup>	II	32	II-IV	BM (Prochymal)	24 ΠΥ (77%), 5 ΜΥ (16%)	Απόκριση του μεγαλύτερου ποσοστού ασθενών με de novo GvHD στον συνδυασμό «off the shelf» MSCs τρίτου χώρου και κορτικοστεροειδών.
VonBonin et al <sup>66</sup>	I	13	III-IV	BM	1ΠΥ (7%), 1ΜΥ (7%)	Μικρή αποτελεσματικότητα MSCs καλλιεργημένων σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια μη συμβατών δοτών.
Osiris Therapeutics, Inc <sup>67</sup>	III	192	II-IV	BM (Prochymal)	86 ΠΥ (45%) ομάδα MSCs. 88 ΠΥ (45%) ομάδα placebo	Η ομάδα που έλαβε MSCs για ανθεκτικό σε στεροειδή και de novo GvHD δεν διέφερε σημαντικά έναντι της placebo. Σημαντική βελτίωση ασθενών με ανθεκτικό σε στεροειδή GvHD ήπατος και GI. Τάση καλύτερης απόκρισης παιδιατρικών ασθενών.
Baron et al <sup>66</sup>	I	20	Προφύλαξη	BM	9 εμφανίσεις aGvHD (45%)	Η χορήγηση MSCs είναι καλά ανεκτή σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες μετά από ασύμβατη, μη μυελοκατασταλτική HSCT, χωρίς να παρεμποδίζεται η GvL δράση.
Lucchini et al <sup>68</sup>	I	11	I-IV	BM	2 ΠΥ (23,8%), 5 ΜΥ (47,6%)	Ασφαλής χορήγηση MSCs καλλιεργημένων σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια σε παιδιατρικούς ασθενείς.

UCB: αίμα ομφάλιου λώρου, MSCs: μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, BM: μυελός των οστών, GvHD: νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή, ΠΥ: πλήρης ύφεση, ΜΥ: μερική ύφεση, GI: γαστροεντερικό.

Πίνακας 2. (συνέχεια) Κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.						
Βιβλιογραφία	Φάση μελέτης	Ασθενείς	Βαθμός (grade)	Πηγή MSCs	Αποτελέσματα	Σχόλια
Prasad et al <sup>44</sup>	I	12	III-IV	BM (Prochymal)	7 ΠΥ (58%), 2 ΜΥ (17%)	Η πρώτη μελέτη χρήσης προπαρασκευασμένων MSCs σε παιδιατρικούς ασθενείς. Καλύτερη κλινική απάντηση στο GI σύστημα.
Wu et al <sup>69</sup>	I	2	IV	UCB	2 ΠΥ (100%)	Η πρώτη κλινική μελέτη χρήσης MSCs προερχόμενων από UCB. Σημαντική βελτίωση ασθενών με aGvHD μετά από χορήγηση MSCs.
Kuzmina et al <sup>70</sup>	II	37	Προφύλαξη	BM	1/ 19 aGvHD (5,3%)	Ο συνδυασμός MSCs με την τυπική πρακτική προφύλαξης GvHD απέτρεψε σημαντικά το οξύ όχι όμως και το χρόνιο GvHD.
Resnick et al <sup>40</sup>		50	IV (42 ασθενείς) II-III (8 ασθενείς)	BM	17 ΠΥ (34%)	Καλύτερη απόκριση ασθενών με aGvHD <grade IV, ασθενών οι οποίοι απάντησαν από την 1η έγχυση και παιδιατρικών ασθενών.
Ball et al <sup>41</sup>	Αναδρομική	37	III-IV	BM	24 ΠΥ (65%), 8 ΜΥ (22%)	Η μεγαλύτερη μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς.
Introna et al <sup>45</sup>	I	40	II-IV	BM	11 ΠΥ (27,5%), 16 ΜΥ (40%)	Χορήγηση MSCs τρίτου χώρου που έχουν εκπυχθεί σε έκπλυμα αιμοπεταλίων.

UCB: αίμα ομφάλιου λώρου, MSCs: μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, BM: μυελός των οστών, GvHD: νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή, ΠΥ: πλήρης ύφεση, ΜΥ: μερική ύφεση, GI: γαστροεντερικό.

στα κορτικοειδή aGvHD και παρά την ύπαρξη εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών, η πρόγνωση σε αυτή την περίπτωση είναι φτωχή, με μόλις το 16% των ασθενών να επιβιώνει στα δύο χρόνια ενώ ασθενείς με ανθεκτική στα κορτικοειδή grIV aGvHD καταλήγουν, στην πλειονότητά τους, μερικές εβδομάδες μετά.

Η χορήγηση MSCs σε αυτή την ομάδα ασθενών αποτελεί ελκυστική θεραπευτική επιλογή παρά τα περιορισμένα και πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα των προκλινικών μελετών. Η επιλογή της κλινικής χορήγησης MSCs μπορεί να υποστηριχθεί από τα ακόλουθα δεδομένα: την επιβεβαιωμένη *in vitro* ικανότητα των MSCs να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων αλλοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων<sup>10</sup>, την ασφαλή συγχώρηση αυτόλογων MSCs και αρχεγόνων αιμοποιητικών κυττάρων σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση για καρκίνο του μαστού<sup>35</sup> και τα προκαταρκτικά αποτελέσματα που καταδεικνύουν μείωση της aGvHD σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες που υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση και έλαβαν μαζί με το μυελικό μόσχευμα και MSCs από τον ίδιο δότη<sup>36</sup>.

Σημείο αναφοράς αποτελεί το case report που δημοσιεύθηκε το 2004 από την ομάδα της Le Blanc<sup>37</sup>, όπου και αναφέρθηκε η επιτυχής αντιμετώπιση σε 9-χρονο ασθενή ανθεκτικής grIV aGvHD με τη χορήγηση MSCs από «τρίτο χώρο». Σταθερή και πλήρης ύφεση επιτεύχθηκε μετά τη δεύτερη έγχυση MSCs. Η σηματικότητα της παρουσίασης του περιστατικού έγκειται στο γεγονός ότι τα κύτταρα προερχόταν από την απλοταυτόσημη μητέρα και όχι από το δότη του μοσχεύματος. Στηριζόμενοι στην επιτυχή έκβαση του ασθενούς η ίδια ομάδα χορήγησε MSCs σε άλλους οχτώ ασθενείς με ανθεκτική aGvHD και έξι από αυτούς εμφάνισαν κλινική απάντηση<sup>38</sup>.

Υπό την αιγίδα του EBMT διενεργήθηκε μελέτη φάσης II όπου και αξιολογήθηκε η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της χορήγησης MSCs σε 55 ασθενείς με ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>39</sup>. Η Δm δόση χορηγούμενων κυττάρων ήταν  $1 \times 10^6/\text{kg}$ . Οι ασθενείς έλαβαν MSCs από HLA-συμβατό δότη ή από απλοταυτόσημο δότη ή από HLA-μερικώς συμβατό δότη. Σε 27 ασθενείς έγινε μια έγχυση MSCs ενώ σε 28 ασθενείς πραγματοποιήθηκαν 2 ή περισσότερες εγχύσεις. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια κατά την έγχυση. Τριάντα ασθενείς εμφάνισαν πλήρη απάντη-

ση της aGvHD (55%). Δεν υπήρξε καμία συσχέτιση της απάντησης με το είδος του δότη των MSCs, αλλά τα ποσοστά απάντησης ήταν υψηλότερα στα παιδιά (84%) έναντι των ενηλίκων (60%). Οι ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη απάντηση είχαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση στον 1 χρόνο (37 vs 72%,  $p=0,002$ ) και υψηλότερη επιβίωση (53 vs 16%) έναντι των υπολοίπων. Στη βάση των ενθαρρυντικών αυτών αποτελεσμάτων, διενεργείται σήμερα, πάλι υπό την αιγίδα του EBMT, προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, όπου και θα αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των MSCs στη θεραπεία ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα της δεύτερης μεγαλύτερης ακαδημαϊκής πολυκεντρικής μελέτης με χρήση MSCs στη θεραπεία ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD<sup>40</sup>. Σε 50 ασθενείς χορηγήθηκαν 74 (1-4) εγχύσεις MSCs για 54 επεισόδια ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD. Η νόσος ήταν gr IV σε 42 επεισόδια. Η Δm δόση χορηγούμενων κυττάρων ήταν  $1,14 \times 10^6/\text{kg}$ , ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων χορηγήθηκαν έτοιμα ψυγμένα κύτταρα. Δεν αναφέρθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια κατά την έγχυση. Αρχική απάντηση παρατηρήθηκε στο 66% των ασθενών αλλά πλήρης υποχώρηση των συμπτωμάτων στο 34%. Από τη μελέτη διαπιστώθηκε καλύτερη ανταπόκριση σε ασθενείς που είχαν aGvHD < gr IV, σε αυτούς που η νόσος απάντησε από την πρώτη έγχυση και στην παιδιατρική ομάδα των ασθενών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε ως ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες για τη επιβίωση, την απάντηση στη πρώτη έγχυση των MSCs και τη νεαρή (<18 ετών) ηλικία.

Και οι δύο μελέτες που προαναφέρθηκαν έδειξαν καλύτερη ανταπόκριση των MSCs στον παιδιατρικό πληθυσμό. Η μεγαλύτερη όμως μελέτη που αξιολόγησε τη δράση των MSCs σε παιδιά δημοσιεύθηκε το 2013 από Ιταλική ομάδα<sup>41</sup>. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η δράση των MSCs σε 37 παιδιά (3 μηνών – 17 ετών) που εμφάνιζαν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD. Τα κύτταρα στην πλειονότητα των περιπτώσεων προερχόταν από HLA-μερικώς συμβατό δότη, ενώ το Δm διάστημα χορήγησης των κυττάρων ήταν 13 (5 – 85) ημέρες από την έναρξη χορήγησης των κορτικοειδών. Τα 34/37 παιδιά έλαβαν πολλαπλές εγχύσεις MSCs. Πλήρης απάντηση παρατηρήθηκε σε 24 παιδιά (65%), μερική απάντηση σε 8 και καμία απάντηση μόνο σε 5 παιδιά. Η θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση (TRM) ήταν 17% στα παιδιά που παρουσίασαν πλήρη ύφεση μετά την έγχυση των MSCs έναντι 69% των ασθενών που δεν είχαν καμία ανταπόκριση ( $p=0,001$ ). Με Δm διάστημα παρακολούθησης τα 2,9 χρόνια, η ολική επιβίωση (OS) ήταν 65% στα παιδιά με τη πλήρη ύφεση, έναντι 0% των ασθενών χωρίς ανταπόκριση ( $p=0,001$ ). Τα παιδιά που έλαβαν νωρίς τα MSCs (μεταξύ 5<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη χορή-

γηση των κορτικοειδών) παρουσίασαν ισχυρή τάση για καλύτερη OS και χαμηλότερη TRM έναντι των ασθενών που έλαβαν αργά τα κύτταρα (μετά τη 13<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη χορήγησης των κορτικοειδών).

Πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, η οποία όμως διενεργήθηκε από ιδιωτική εταιρεία που παράγει MSCs, αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα πολλαπλών εγχύσεων MSCs προερχόμενων από τρίτο χώρο, έναντι χορήγησης placebo σε ασθενείς που εμφανίζουν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>42</sup>. Ενώ δε παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην επίτευξη πλήρους ύφεσης μεταξύ των 2 σκελών της μελέτης (35 έναντι 30%), σε υποανάλυση που διενεργήθηκε διαπιστώθηκε ότι ασθενείς που είχαν προσβολή ήπατος και εντέρου παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης μετά τη χορήγηση των MSCs έναντι αυτών που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των MSCs που προέρχονται από HLA-μερικώς συμβατό δότη, που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην απουσία έκφρασης στην επιφάνεια των μεσεγγυματικών κυττάρων αντιγόνων τάξης II (MHC II), έχει οδηγήσει αρκετούς δημόσιους και ιδιωτικούς φορείς στη δημιουργία τράπεζας MSCs έτσι ώστε να είναι άμεσα διαθέσιμα όταν θα τα χρειασθεί ο κλινικός ιατρός. Η ιδιωτική και εγκεκριμένη από το FDA εταιρεία Osiris, αξιολόγησε τη δραστηριότητα έτοιμων, προπαρασκευασμένων MSCs (Prochymal) ως θεραπεία πρώτης γραμμής, σε συγχορήγηση με κορτικοειδή, σε πρωτοδιαγνωσθείσα aGvHD<sup>43</sup>. Παρατηρήθηκε αρχική απάντηση στο 94% των ασθενών, ενώ το 77% από τους 31 διαθέσιμους ασθενείς εμφάνισε πλήρη ύφεση. Δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα κατά την έγχυση ούτε δημιουργία έκτοπου ιστού, έως και 2 χρόνια μετά τις εγχύσεις. Τα κύτταρα από την ίδια εταιρεία αξιολογήθηκαν στη συνέχεια σε παιδιατρικό πληθυσμό που εμφάνιζε ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD με προσβολή κυρίως του εντέρου. Δώδεκα ασθενείς ηλικίας κάτω των 18 ετών έλαβαν πολλαπλές εγχύσεις έτοιμων MSCs (δύο ανά εβδομάδα για 4 εβδομάδες). Συνολικά 7 από τους 12 ασθενείς κατέδειξαν πλήρη ύφεση (58%), ενώ 9/12 ασθενείς παρουσίασαν πλήρη υποχώρηση των νοσημάτων τους από το ΓΕΣ<sup>44</sup>.

Σημαντικός περιορισμός στην κλινική εφαρμογή των MSCs είναι η χρήση, κατά την έκπτυξή τους στην καλλιέργεια, προϊόντων ζωικής προέλευσης, γεγονός που ενέχει το δυνητικό κίνδυνο άνοσης απάντησης του ασθενούς σε ζωικές πρωτεΐνες που προσκολλώνται στην επιφάνεια των MSCs, αλλά και την πιθανότητα λοιμωδών επιπλοκών από ξένα προς τον ανθρώπινο οργανισμό παράγωγα. Πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη φάσης I αξιολόγησε την ασφάλεια χορήγησης MSCs που έχουν εκπτυχθεί σε έκπλυμα αιμοπεταλίων (platelet lysate) σε 40 ασθενείς (15 παιδιά – 25 ενήλικες) που εμφάνισαν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>45</sup>. Η Δm δόση των χορηγούμενων κυττάρων

ήταν  $1,5 \times 10^6/\text{kg}$ , ενώ ο Δm αριθμός εγχύσεων ανά ασθενή, 3. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια ή αντίδραση κατά και αμέσως μετά την έγχυση, ενώ οι 86 ανεπιθύμητες ενέργειες που καταγράφηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης οφειλόταν κατά κύριο λόγο σε λοιμώξεις (72,1%) και κατά δεύτερο λόγο (6,9%) σε οργανική ανεπάρκεια, ως συνέπεια της προόδου της aGvHD.

### Κλινική χρήση των MSCs στη προφύλαξη της aGvHD

Αντικρουόμενα αποτελέσματα παρουσιάζουν εργασίες που αξιολόγησαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των MSCs ως προφύλαξη έναντι της aGvHD. Ο κύριος λόγος για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων αποτελεί το γεγονός ότι οι περισσότερες μελέτες περιλαμβάνουν μικρό αριθμό ασθενών και δεν υπάρχει ομάδα control για συγκριτικό έλεγχο. Μελέτη εκτίμησε την ασφάλεια της συγχρόνησης MSCs και περιφερικών αρχηγόνων αιμοποιητικών κυττάρων (PBSCs) και έκανε σύγκριση στην έκβαση της μεταμόσχευσης με ομάδα ιστορικού control ασθενών με παρόμοια χαρακτηριστικά<sup>46</sup>. Είκοσι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες έλαβαν MSCs από τρίτο χώρο, 30-120 λεπτά πριν την έγχυση των PBSCs αφού είχε προηγηθεί μειωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη αντίδραση κατά ή και μετά την έγχυση, ενώ 19 από τους 20 ασθενείς είχαν ταχεία και ικανοποιητική εμφύτευση (σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε απόρριψη του μοσχεύματος). Η επίπτωση της aGvHD στις 100 ημέρες ήταν 35%, ενώ η επίπτωση της aGvHD στην ομάδα του ιστορικού control που έλαβε μόνο PBSCs ήταν 56%. Από την ίδια μελέτη ο κίνδυνος θανάτου στο έτος από aGvHD ή λοίμωξη σε έδαφος aGvHD ήταν 10% ενώ στην ομάδα του ιστορικού control ο κίνδυνος θανάτου στο έτος ήταν 31% ( $p=0,04$ ). Πρόσφατα αξιολογήθηκε η συγχρόνηση μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενων από ομφαλοπλακουντικό αίμα (UC-MSCs) μαζί με PBSCs από απλοταυτόσημο δότη, χωρίς αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων σε 21 ασθενείς που έπασχαν από σοβαρή απλαστική αναιμία<sup>47</sup>. Η μη αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από δότη που μοιράζεται τον ένα μόνο απλότυπο με τον ασθενή, αποσκοπούσε στη διασφάλιση υψηλού ποσοστού εμφύτευσης, θα περίμενε όμως κανείς να αυξήσει τα ποσοστά της aGvHD. Πράγματι όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν ταχεία και πλήρη εμφύτευση του αλλογενούς μοσχεύματος ενώ ενθαρρυντικό είναι ότι μόλις 9/21 ασθενείς (42,8%) εκδήλωσαν aGvHD (gr II-IV) και ένας μόνο κατέληξε. Προβληματισμός βέβαια υπάρχει σχετικά με το ρόλο των MSCs προς την κατεύθυνση της δράσης του μοσχεύματος έναντι της λευχαιμίας (Graft-Versus-Leukemia- GVL) ιδιαίτερα όταν χορηγούνται σε ασθενείς προφυλακτικά έναντι της aGvHD. Μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2008 και

αξιολόγησε τη συγχρόνηση αιμοποιητικών κυττάρων με MSCs που προερχόταν από τον δότη, ενώ επιβεβαίωσε τα χαμηλότερα ποσοστά της aGvHD στους ασθενείς που έλαβαν MSCs, κατέδειξε υψηλότερα ποσοστά υποτροπής της λευχαιμίας στην ίδια ομάδα ασθενών<sup>48</sup>. Περιορισμός βέβαια της μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι συμπεριέλαβε μικρό αριθμό ασθενών (25) και επομένως τα συμπεράσματά της θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή.

### Προβληματισμοί - Μελλοντικές κατευθύνσεις

Παρά τα 40 χρόνια που μεσολαβούν από την ταυτοποίηση των MSCs από τον Friedenstein έως σήμερα, τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών που καταγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία, καθιστούν σαφές ότι τα αναπάντητα ερωτήματα είναι περισσότερα σε σχέση με αυτά που έχουν αποσαφηνισθεί. Η απουσία ενός ειδικού δείκτη που θα ταυτοποιεί τα MSCs, καθιστά επισφαλές κατά πόσο απομονώνεται και χρησιμοποιείται ομοιογενής ομάδα κυττάρων από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες. Κρίνεται σήμερα ως επιτακτική η ανάγκη να εφαρμοστούν πιο αυστηροί όροι στην ταυτοποίηση των MSCs, πέραν των φαινοτυπικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών. Η επιβεβαιωμένη ανοσοκατασταλτική δράση των MSCs «γεννά» ερωτήματα κατά πόσο μπορεί να επηρεάζει τη δράση του μοσχεύματος έναντι του κακοήθους κλώνου (GVL). Επιπρόσθετα, αν και η ομάδα των Karlsson et al. κατέδειξε ότι η έγχυση MSCs δεν επηρεάζει τη δράση των ειδικών έναντι ιών T-λεμφοκυττάρων<sup>49</sup>, δεν είναι ακόμη σαφές αν η χορήγησή τους καθιστά τους ασθενείς επιρρεπείς σε λοιμώξεις μετά τη μεταμόσχευση. Ασαφής παραμένει και ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στη δράση των MSCs. Έχει αναφερθεί ότι, απουσία IFN- $\gamma$  τα MSCs είναι ευάλωτα στη λύση από ενεργοποιημένα NK κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από προκλινικά δεδομένα που κάνουν λόγο για ανάγκη «αδειοδότησης» των MSCs από το φλεγμονώδες περιβάλλον για ενίσχυση της θεραπευτικής τους δράσης. Είναι γνωστό, ότι αυξημένα επίπεδα IFN- $\gamma$  προάγουν την έκφραση αντιγόνων τάξης II στα MSCs, αυξάνοντας τον κίνδυνο ταχείας απόρριψής τους. Από την άλλη πλευρά, καθώς η ανοσορυθμιστική τους δράση ασκείται κύρια μέσω διαλυτών παραγόντων, ο κίνδυνος αυτός ενδεχομένως να μην είναι ιδιαίτερα επίσημος. Παρ' όλα αυτά, είναι σαφές ότι το χρονικό διάστημα χορήγησης των κυττάρων για την αντιμετώπιση μιας φλεγμονώδους – ανοσολογικής διεργασίας καθώς και το πόσο ασφαλής είναι η χορήγηση μη συμβατών προς τον λήπτη MSCs δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Η χαμηλή ανοσογονικότητα των MSCs φαίνεται πως επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων για αυτό γίνεται σήμερα προσπάθεια αντικατάστασης ζωικών ορών (δυσνητικός κίνδυνος μετάδοσης

ζωικών παθήσεων, ευαισθητοποίηση σε αντιγόνα ζωικής προελεύσεως) με αυτόλογο ορό, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, ΑΒ πλάσμα, με αντικρουόμενα ως τώρα αποτελέσματα. Η ανάγκη χορήγησης ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων (ο οποίος δεν έχει προσδιοριστεί σαφώς), ωθεί σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες των κυττάρων (passages). Οι διαδοχικές ανακαλλιέργειες όμως φαίνεται ότι επηρεάζουν την ποιότητα τους, καθώς κύτταρα που χορηγούνται μετά από αρκετά passages ενέχουν τον κίνδυνο της γενετικής αστάθειας και των μειωμένων λειτουργικών ιδιοτήτων, ενώ αντιθέτως κύτταρα που προέρχονται από αρχικά passages αποτελούν ίσως πιο ανομοιογενή πληθυσμό. Προβληματισμό επίσης δημιουργεί η ανάγκη έγχυσης επαναληπτικών δόσεων MSCs για την αντιμετώπιση υποτροπιάζουσών παθήσεων όπως η aGvHD. Λαμβάνο-

ντας υπόψη τον περιορισμένο χρόνο ζωής των κυττάρων, καθώς και το ότι η δράση τους ασκείται πιθανότατα μέσω διαλυτών παραγόντων, γεννάται το ερώτημα, κατά πόσο μια δόση χορηγούμενων κυττάρων θα επιτρέψει την ασφαλή προοδευτική διακοπή της υπόλοιπης ανοσοκατασταλτικής αγωγής που λαμβάνει ο ασθενής.

Είναι επομένως απολύτως κατανοητό, ότι ο δρόμος που έχουμε ακόμη να διανύσουμε είναι μακρύς αλλά πιθανόν μέσα από τη διενέργεια προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών να δοθούν απαντήσεις που θα επιτρέψουν την χορήγηση των MSCs στη θεραπεία σημαντικών επιπλοκών της αλλογενούς μεταμόσχευσης με υψηλό ποσοστό αποτελεσματικότητας καθιστώντας την τελευταία ελκυστική θεραπευτική επιλογή σε περισσότερους ασθενείς που την έχουν ανάγκη.

## Mesenchymal stromal cells for acute graft versus host disease

by Anastasia Papadopoulou, Ioannis Batsis

*Haematology Department - Bone Marrow Transplantation Unit, Gene and Cell Therapy Center,  
"G. Papanikolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece*

**ABSTRACT:** Severe acute graft versus host disease (aGvHD) is a major cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Mesenchymal stromal cells (MSCs) exhibit strong immunomodulatory properties that prompted their clinical use in severe aGvHD. A number of pre-clinical and clinical phase I-II studies have suggested that infusion of MSCs is safe and potentially effective in preventing or treating aGvHD. However, MSCs still present limitations and definitive proof of their efficacy is lacking thus far. This article reviews the literature on the administration of MSCs in animal models of allogeneic HSCT and the results of clinical trials investigating the use of MSCs to prevent or treat aGvHD. The data emphasize the significance of this therapeutic approach and indicate that large, multicenter, randomized clinical trials are needed to more precisely assess the impact of MSCs infusion on the control of aGvHD.

## Βιβλιογραφία

1. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975; 292:895-902.
2. Thomas E, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975; 292:832-843.
3. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009; 373:1550-1561.
4. Ringdén O, Nilsson B. Death by graft-versus-host disease associated with HLA mismatch, high recipient age, low marrow cell dose, and splenectomy. *Transplantation.* 1985; 40:39-44.
5. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood.* 1985; 66:664-672.
6. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990; 75:555-562.
7. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood.* 1999; 93:467-480.
8. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8:111-137.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-147.
10. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99:3838-3843.
11. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006; 107:367-372.
12. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110:3499-3506.

13. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007; 83:71–76.
14. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30:42–48.
15. Chung NG, Jeong DC, Park SJ, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2004; 80:370–376.
16. Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006; 176:7761–7767.
17. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006; 24:2582–2591.
18. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007; 21:1992–1999.
19. Joo S-Y, Cho K-A, Jung Y-J, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. *Cytotherapy*. 2010; 12:361–370.
20. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008; 38:1745–1755.
21. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24:386–398.
22. Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009; 27:1954–1962.
23. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:141–150.
24. Sheng H, Wang Y, Jin Y, et al. A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*. 2008; 18:846–857.
25. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett*. 2007; 110:91–100.
26. Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004; 103:4619–4621.
27. Mouggiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, et al. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011; 117:4826–4835.
28. Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003; 102:3837–3844.
29. Dazzi F, Marelli-Berg FM. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: close encounters with T cells. *Eur J Immunol*. 2008; 38:1479–1482.
30. Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172:333–348.
31. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003; 5:1028–1038.
32. Jeon M-S, Lim H-J, Yi T-G, et al. Xenoreactivity of human clonal mesenchymal stem cells in a major histocompatibility complex-matched allogeneic graft-versus-host disease mouse model. *Cell Immunol*. 2010; 261:57–63.
33. Yoo HS, Yi T, Cho YK, et al. Mesenchymal stem cell lines isolated by different isolation methods show variations in the regulation of Graft-versus-host disease. *Immune Netw*. 2013; 13:133–140.
34. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007; 109:4119–4126.
35. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18:307–316.
36. Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: A matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29(Suppl. 2):S2.
37. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363:1439–1441.
38. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006; 81:1390–1397.
39. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008; 371:1579–1586.
40. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, et al. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res*. 2013; 3:225–238.
41. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2013; 163:501–509.
42. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, et al. Prochymal improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD), involving the liver and gut: Results of a randomized, placebo-controlled, multicenter phase trial in GVHD. *Biol Blood Marrow Transplantat*. 2010; 16:S169–S170.

43. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15:804–811.
44. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:534–541.
45. Introna M, Lucchini G, Dander E, et al. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20:375–381.
46. Baron F, Lechanteur C, Willems E, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:838–847.
47. Wu Y, Cao Y, Li X, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD. *Stem Cell Res.* 2014; 12:132–138.
48. Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia.* 2008; 22:593–599.
49. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood.* 2008; 112:532–541.
50. Chen W, Li M, Li Z, et al. CXCR4-transduced mesenchymal stem cells protect mice against graft-versus-host disease. *Immunol Lett.* 2012; 143:161–169.
51. Gao L, Liu F, Tan L, et al. The immunosuppressive properties of non-cultured dermal-derived mesenchymal stromal cells and the control of Graft-versus-host disease. *Biomaterials.* 2014; 35:3582–3588.
52. Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, et al. Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev.* 2012; 21:1616–1626.
53. Jang MJ, Kim H-S, Lee H-G, et al. Placenta-derived mesenchymal stem cells have an immunomodulatory effect that can control acute graft-versus-host disease in mice. *Acta Haematol.* 2013; 129:197–206.
54. Jang YK, Kim M, Lee Y-H, et al. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* 2014; 16:298–308.
55. Li H, Guo Z, Jiang X, et al. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells.* 2008; 26:2531–2541.
56. Li ZY, Wang CQ, Lu G, Pan XY, Xu KL. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute Graft-Versus-Host Disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model. *Cell Biochem Biophys.* 2014; 70:115-122.
57. Nevruz O, Avcu F, Ural AU, et al. Immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells on graft-versus-host disease in rats following allogeneic bone marrow transplantation. *Turkish J. Haematol. Off J Turkish Soc Haematol.* 2013; 30:256–262.
58. Xishan Z, Haojun Y, Baoxin H, et al. Mouse flk-1+sca-1-mesenchymal stem cells: functional plasticity in vitro and immunoregulation in vivo. *Transplantation.* 2014; 97:509–517.
59. Badillo AT, Peranteau WH, Heaton TE, Quinn C, Flake AW. Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2008; 141:224–234.
60. Bruck F, Belle L, Lechanteur C, et al. Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* 2013; 15:267–279.
61. Min C-K, Kim B-G, Park G, Cho B, Oh I-H. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39:637–645.
62. Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, et al. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol.* 2008; 36:1370–1376.
63. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:389–398.
64. Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38:389–390.
65. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 40:25–32.
66. Von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43:245–251.
67. Investor Relations | Osiris Therapeutics Announces Preliminary Results for Prochymal Phase III GvHD Trials. Available at <http://investor.osiris.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=407404>
68. Lucchini G, Intron M, Dander E, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:1293–1301.
69. Wu K-H, Chan C-K, Tsai C, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2011; 91:1412–1416.
70. Kuzmina LA, Petinati NA, Parovichnikova EN, et al. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* 2012; 2012:968213.