

RIGENERAZIONE DEL DISCO INTERVERTEBRALE MEDIATA DALLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Gianluca Vadalà, Vincenzo Denaro

UOC di Ortopedia e Traumatologia, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma

Introduzione

La lombalgia è uno dei sintomi più disabilitanti e comuni tra la popolazione adulta nei paesi industrializzati. La prima causa di tale condizione clinica è la degenerazione del disco intervertebrale, processo caratterizzato da una progressiva riduzione del contenuto dei proteoglicani nel Nucleo Polposo, responsabile della disidratazione del disco e della perdita delle sue proprietà morfofunzionali e biomeccaniche.

A oggi, il trattamento della lombalgia è basato su approcci conservativi e invasivi che, tuttavia, non sono in grado di ripristinare le caratteristiche fisiologiche del disco, ma riescono solo a supportare la riduzione della sintomatologia algica e/o rallentare la degenerazione. In più, queste opzioni sono caratterizzate da comorbidità, costi e rischi secondari non trascurabili.

Il potenziale utilizzo di differenti tipi di cellule stromali/mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) per il trattamento della degenerazione del disco intervertebrale si è rivelato molto promettente in esperimenti *in vitro* e *in vivo*. La combinazione di differenti citotipi, condizioni colturali precondizionanti, *scaffold* ingegnerizzati e sistemi di somministrazione hanno portato alla ricostituzione della matrice discale, a un aumento della vitalità cellulare e alla rigenerazione tissutale in diverse condizioni sperimentali. Questo articolo ha l'obiettivo di passare in rassegna la letteratura attuale sulla terapia per la degenerazione del disco basata sull'utilizzo di cellule staminali e sui risultati che i diversi approcci hanno prodotto.

La lombalgia colpisce più dell'80% della popolazione generale almeno una volta nella vita, causando elevata morbidità con gravi implicazioni economiche, sociali e psicologiche. La lombalgia si attesta come la prima causa di disabilità in individui con età inferiore ai 45 anni, specialmente di sesso femminile, provocando delle importanti perdite economiche nei Paesi sviluppati (1).

La principale causa della lombalgia è la degenerazione del disco intervertebrale. Questo è costituito da tre tessuti altamente specializzati: il Nucleo Polposo (NP), l'Anello Fibroso (AF) e i piatti vertebrali, che connettono il disco ai corpi vertebrali adiacenti. L'AF è un anello fibrocartilagineo, composto da lamelle di fibre collagene di tipo I dense, concentriche e altamente orientate, le quali costituiscono una matrice organizzata ospitante cellule simil-fibroblastiche. Il NP è formato da una matrice amorfa, gelatinosa, ricca in proteoglicani (principalmente aggregano) e collagene di tipo II. L'aggregano, un proteoglicano di grandi dimensioni in grado di interagire con l'acido ialuronico, è composto da numerosi GlicosAminoGlicani (GAG) solforati carichi negativamente (condroitin solfato e cheratan solfato) capaci di legarsi a molecole di acqua. L'elevato livello di idratazione conferisce al NP una pressione di rigonfiamento che è responsabile del mantenimento dell'altezza dello spazio discale, oltre a conferire al disco stesso resistenza meccanica a torsione, flessione e compressione. Nel NP sono localizzate piccole cellule simil-condrocitiche, responsabili della sintesi dei proteoglicani per il mantenimento del microambiente della matrice (2).

La degenerazione del disco intervertebrale è un processo cronico dipendente principalmente dall'età, caratterizzato da una progressiva riduzione del contenuto dei proteoglicani (e

conseguentemente del grado di idratazione) nel NP, con la successiva incapacità, da parte del disco, di far fronte a forze compressive causando instabilità (3).

La degenerazione discale può evolvere verso diversi disordini vertebrali, tra cui l'erniazione del disco, la spondilolistesi degenerativa e stenosi del canale vertebrale con associati sintomi neurologici, tra cui radicolopatia e mielopatia. Le attuali opzioni per il trattamento della lombalgia e della degenerazione discale spaziano da approcci conservativi, come il riposo, la terapia analgesica e antinfiammatoria e la fisioterapia, fino ad approcci invasivi, tra cui infiltrazioni epidurali di steroidi, tecniche ablativo e chirurgiche, come la discectomia, la sostituzione totale del disco, la laminectomia e la fusione vertebrale (4).

Tuttavia, queste opzioni hanno dimostrato efficacia limitata e non consentono di ottenere risultati affidabili e prevedibili. Infatti, esse agiscono attenuando i sintomi e non mirano al meccanismo fisiopatologico della degenerazione discale. Per questo motivo, si avverte un bisogno emergente di individuare un trattamento precoce per la lombalgia che possa prevenire, rallentare, arrestare o finanche invertire il processo degenerativo.

I significativi avanzamenti nei campi della terapia con cellule staminali hanno consentito di sviluppare protocolli rigenerativi innovativi mirati a interferire con la storia naturale della degenerazione discale, mirando alla riparazione/rigenerazione del disco e al recupero funzionale. Lo scopo di questo articolo è discutere l'uso potenziale di cellule staminali stromali/mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo per la rigenerazione del disco intervertebrale.

Fisiopatologia della degenerazione del disco intervertebrale

L'eziologia e la fisiopatologia dettagliate della degenerazione del disco intervertebrale rimangono ancora poco chiare. Tuttavia, è noto che la progressiva riduzione di aggregato e acqua libera nel NP è responsabile delle principali alterazioni strutturali coinvolte nel processo degenerativo (2). Ciò sembra disturbare il normale equilibrio tra le funzioni anaboliche e cataboliche delle cellule del NP, causando ridotta sintesi, aumentato turnover o una combinazione di questi due processi nella matrice del NP (5).

In più, il progressivo calo del numero e della densità delle cellule residenti nel NP è stato associato sia con l'invecchiamento che con la degenerazione discale. È stato ipotizzato che questo comprometta la capacità del disco di compensare queste alterazioni producendo e mantenendo una matrice extracellulare funzionale (6).

La conseguenza diretta della riduzione del contenuto dei proteoglicani nel NP è la disidratazione, che provoca la riduzione dell'altezza degli spazi discali e la capacità del disco di sopportare carichi meccanici (7). La distribuzione anomala delle forze meccaniche attraverso il disco degenerato provoca traumi e microlacerazioni dell'AF, erniazione discale e alterazioni patologiche dei corpi vertebrali tra cui sclerosi subcondrale, ossificazione dell'*end-plate* e osteofitosi. La collocazione anatomica relativamente isolata, l'avascolarità e la bassa attività metabolica del disco intervertebrale potrebbero essere le ragioni principali per l'apparente incapacità del disco di auto-rigenerarsi di fronte al danno e alla degenerazione (1).

Terapia basata su cellule staminali

Recuperare la capacità del disco di ricostituire la matrice e ristabilire il contenuto originale dei proteoglicani potrebbe aumentare l'idratazione dello stesso e al miglioramento delle sue proprietà

biomeccaniche (1). La progressiva perdita di cellule che caratterizza la degenerazione e l'invecchiamento del disco intervertebrale potrebbe essere limitata iniettando cellule esogene con lo scopo di supplementare e ricostituire la popolazione originale del disco stesso. Questo approccio terapeutico basato sull'utilizzo di cellule è stato indagato usando differenti tipi cellulari, tra cui cellule del disco (8) e cellule progenitrici (9).

Il trapianto di condrociti autologhi del disco è attualmente sotto valutazione clinica come possibile approccio per prevenire le sequele degenerative dopo chirurgia lombare. A oggi, questo metodo ha dimostrato di essere sicuro e di diminuire il grado di lombalgia, di ridurre l'assottigliamento del disco e di ricostituire parzialmente l'ambiente fisiologico del NP (10). Tuttavia, questo approccio è attuabile solo dopo la realizzazione di una discectomia ed è limitata da bassi livelli di espansione e dalla perdita delle caratteristiche fenotipiche delle cellule quando espanso in una coltura cellulare in *monolayer*. Uno studio recente ha dimostrato che quest'ultima limitazione potrebbe essere superata coltivando le cellule autologhe del NP insieme a cellule staminali mesenchimali provenienti dal midollo osseo. Questo processo consente di ottenere cellule del NP attivate che hanno dimostrato l'abilità di aumentare la sintesi di collagene di tipo II e dei proteoglicani e di ripristinare l'altezza dello spazio discale (11).

D'altra parte, la terapia a base di cellule staminali è caratterizzata da bassa morbidity al sito di prelievo (problema importante in chirurgia vertebrale), semplicità di espansione *ex vivo* e modulazione favorevole del fenotipo prima o dopo il trapianto.

Le cellule staminali sono definite come cellule indifferenziate caratterizzate da elevato potenziale proliferativo, capacità di auto-rinnovamento e differenziamento in multiple linee cellulari (1). Le cellule staminali adulte possono essere prelevate da tessuti completamente differenziati, tra cui midollo osseo, tessuto adiposo, muscolare, cutaneo, periostale, dal sangue, dai vasi, dalle membrane sinoviali e dall'osso trabecolare (12). La loro prima funzione è quella di rimpiazzare cellule preesistenti che siano senescenti e/o danneggiate, seguendo un percorso di differenziamento lungo una specifica linea cellulare, così da garantire e mantenere l'omeostasi fisiologica dei tessuti in cui risiedono. Dato che possono essere isolate direttamente dai tessuti del paziente, l'applicazione delle cellule staminali adulte in medicina rigenerativa non solleva alcuna questione etica.

L'uso potenziale di cellule staminali adulte, come quelle derivate dal midollo osseo (MSC), dal tessuto muscolare (*Muscle-derived Stem Cells*, MdSCs), dal tessuto adiposo (*Adipose Stem Cells*, ASCs), le cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), le cellule staminali della membrana olfattiva (*Olfactory Stem Cells*, OSCs), le cellule staminali sinoviali e le cellule staminali discali, è stato preso in considerazione per la rigenerazione del disco intervertebrale (12). Tutti questi citotipi hanno dimostrato la capacità di differenziarsi verso linee cellulari di derivazione mesenchimale, tra cui grasso, cartilagine, osso e muscolo. In più, si è dimostrato che tutti questi tipi cellulari originano dalle cellule residenti nella zona perivascolare, come periciti e cellule reticolari avventiziali dei sinusoidi del midollo osseo (12).

Esistono diversi metodi per utilizzare le cellule staminali adulte per la rigenerazione del disco intervertebrale:

- possono essere prelevate, manipolate in sala operatoria e iniettate;
- possono essere isolate ed espanse *ex vivo* e poi trapiantate nel disco come cellule indifferenziate o
- pre-differenziate con l'utilizzo di fattori di crescita o metodi di co-coltura;
- possono essere ingegnerizzate e combinate con idrogels visco-elastici;
- possono essere transfette con geni prescelti e poi iniettate nel disco.
- possono essere anche trapiantate allogenicamente a partire da formulazioni attualmente disponibili in commercio (13).

La somministrazione sistemica di cellule staminali derivate dal midollo osseo è stata testata in un modello animale: anche se non vi è stato un cambiamento significativo nella composizione della matrice cellulare, tale approccio ha dimostrato ridotta reazione all'ipossia, ridotto rischio di erniazione e aumentata sintesi di citochine, condizioni che complessivamente possono favorire il trattamento della degenerazione discale (14).

Effetto terapeutico delle cellule staminali nella rigenerazione del disco

Negli ultimi dieci anni numerosi studi *in vitro* hanno sollevato la possibilità di considerare l'uso di cellule staminali adulte per il trattamento della degenerazione del disco intervertebrale.

Ciò è stato postulato dopo che le cellule staminali mesenchimali umane sono state riconosciute per la loro capacità di differenziarsi in cellule simil-condrocitiche del NP se coltivate in condizioni discogeniche (es. aggiungendo alla coltura fattori di crescita condrogenici e/o co-coltivando le cellule staminali con cellule del NP) (15). Studi di co-coltura hanno dimostrato che un effetto sinergico e un *cross-talk* tra MSC e cellule del NP potrebbero aumentare la sintesi delle proteine della matrice extracellulare del NP e indurre il differenziamento in cellule del NP (15, 16).

Il nostro gruppo ha studiato il meccanismo di interazione tra MSC e cellule del NP prelevate da dischi in degenerazione co-coltivandole in un sistema di coltura tridimensionale caratterizzato da una distanza breve e tale da consentire interazioni di tipo paracrino tra le cellule, caratteristica tipica del NP. I profili di espressione genica sono stati analizzati in entrambi i tipi cellulari e hanno mostrato che le MSC avevano acquisito un fenotipo simil-condrocitico e influenzato i livelli di mRNA (*Messenger Ribonucleic Acid*) nelle cellule umane del NP, provocando un aumento dell'espressione di collagene di tipo II da parte delle cellule del NP, mentre la sintesi dell'aggreco era diminuita (15).

Uno studio recente ha confermato la nostra ipotesi (15) che le cellule del NP da sole e le MSC co-coltivate con cellule del NP mostrano una maggiore espressione di collagene di tipo II e aggreco, così come un aumento del contenuto dei GAG, se confrontate con colture contenenti le sole MSC. Tuttavia, la presenza di condizioni degenerative nel mezzo di coltura hanno aumentato drammaticamente l'espressione dei geni catabolici nei gruppi delle sole cellule del NP, mentre questo effetto dannoso ha avuto solo una leggera influenza nei gruppi in co-coltura, che hanno dimostrato di essere più resistenti all'infiammazione e l'ipossia. Configurare un micropellet invece di coltivare cellule individuali ha dimostrato di ridurre l'espressione di geni catabolici nonostante le condizioni ipossiche e infiammatorie (17)].

Alcuni ricercatori (18) hanno approfondito ulteriormente questa interazione paracrina isolando MSC, cellule dell'AF e del NP dalle vertebre dello stesso donatore e coltivate insieme. Le co-culture erano caratterizzate da aumentati livelli di mRNA dei componenti della matrice (tra cui collagene di tipo II, aggreco e versicano), dei fattori di crescita (EGF, IGF-1, TGF- β etc.) e ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and IL-6) rispetto alle monoculture (18).

Evidenze di efficacia in modelli preclinici

Il disco intervertebrale è caratterizzato da avascolarità, ipossia, basso pH, iperosmolarità e basso contenuto di glucosio. Tutte queste caratteristiche lo rendono un ambiente ostile che potrebbe esaurire il suo intrinseco potenziale di autoriparazione e antagonizzare l'attecchimento di cellule staminali esogene in seguito al trapianto. La sopravvivenza a lungo termine delle MSC in seguito a iniezione intradiscale è stata riportata da numerosi studi. Tra questi, il nostro gruppo

ha dimostrato la presenza delle MSC nel disco lombare di un coniglio sano dopo 6 mesi dal trapianto (16).

Per valutare il ruolo della terapia a base di cellule staminali per la rigenerazione del disco intervertebrale, è cruciale testare approcci rigenerativi su modelli animali che possano realisticamente simulare la condizione umana. Sakai *et al.* sono stati i primi a dimostrare che le MSC derivate dal midollo osseo disperse in una matrice di collagene di tipo II e iniettate in un modello animale di degenerazione discale (coniglio) hanno portato a un aumento del contenuto di proteoglicani, della idratazione e dell'altezza dello spazio discale, che era rimasta costante dopo sei mesi con valutazione alla risonanza magnetica (9).

Da allora, si sono visti avanzamenti significativi grazie a *trial* controllati su animali basati su terapie con cellule staminali. Una *review* sistematica e una metanalisi hanno dimostrato che 22 studi hanno riportato miglioramenti statisticamente significativi di altezza discale, sintesi di collagene di tipo II e ridotte alterazioni degenerative alla valutazione istologica (19). Questi risultati sono caratterizzati da eterogeneità statistica a causa del diverso tipo di modello animale (piccola taglia vs grande taglia), citotipo (cellule del NP, MSC, ecc.) e mezzo iniettabile (soluzione acquosa vs *scaffold* biocompatibili) (20).

Uno studio recente di Maidhof *et al.* ha dimostrato che non solo il tipo cellulare e il metodo di somministrazione devono essere considerati, ma anche pianificare un *timing* ideale per il trapianto può influenzare i risultati clinici. Gli autori hanno somministrato MSCs a 3, 14 o 30 giorni dopo il danno e poi hanno valutato l'effetto del timing sulla biochimica e la biomeccanica del disco; le cellule iniettate dopo 3 giorni hanno portato a un significativo miglioramento della ritenzione cellulare, delle proprietà biomeccaniche compressive e della ricostituzione della matrice, mentre le cellule somministrate più tardivamente non hanno prodotto risultati comparabili, dimostrando così che la terapia cellulare può essere determinante se attuata a uno stadio precoce della degenerazione (21).

Uno studio preclinico effettuato dal nostro gruppo ha dimostrato un potenziale effetto collaterale della terapia basata su cellule staminali. Il trapianto di MSC in un modello animale di degenerazione discale (coniglio) ha causato la formazione di osteofiti a causa dell'allontanamento delle cellule staminali dal sito di iniezione (22). Per superare il problema del danneggiamento dell'AF e della dispersione delle cellule, il nostro gruppo ha introdotto un nuovo metodo per somministrare le cellule miste a un idrogel nel NP attraverso l'*endplate* lungo un piccolo tunnel che può essere riparato dopo la somministrazione. Questo potrebbe essere un approccio rigenerativo promettente per trattare gli stadi più tardivi della degenerazione discale (23).

Traduzione clinica

Il primo studio clinico di fase I sul trapianto di MSC autologhe derivate dal midollo osseo ed espanse è stato effettuato da Orozco *et al.* su NP di dieci pazienti affetti da degenerazione discale lombare con AF intatto. Dopo 1 anno dall'intervento chirurgico, l'approccio si è rivelato sicuro e ha dimostrato un miglioramento degli indici di dolore e disabilità (24).

Elabd *et al.* hanno dimostrato che le MSC autologhe derivate dal midollo osseo coltivate in condizioni ipossiche e poi iniettate nei dischi di cinque pazienti ha portato a un miglioramento generale della qualità della vita dopo 4-6 anni dall'intervento chirurgico (25).

In un *trial* clinico randomizzato basato sull'utilizzo di MSC allogene, Noriega *et al.* hanno trattato 24 pazienti con lombalgia e diagnosi di degenerazione discale dividendoli in due gruppi. Un gruppo ha ricevuto una iniezione intradiscale di 25×10^6 MSC per segmento, mentre il gruppo di controllo ha ricevuto l'iniezione di una schiuma mista ad anestetico nella muscolatura paravertebrale. Questo studio preliminare di fase II ha dimostrato efficacia clinica in termini di

riduzione significativa del dolore nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo. In più la degenerazione discale, quantificata dalla scala di Pfirrmann, si è rivelata migliorata nei pazienti trattati mentre è peggiorata nei pazienti del gruppo di controllo (13).

Seppur incoraggianti, questi studi hanno incluso un piccolo numero di pazienti.

Conclusioni

Importanti passi in avanti verso la conoscenza e la comprensione della biologia e biochimica del disco intervertebrale, così come della fisiopatologia della sua degenerazione, sono stati fatti negli ultimi anni. La progressiva perdita cellulare che caratterizza l'invecchiamento e la degenerazione del disco, insieme all'apparente incapacità delle cellule del NP di autoriparare il danno intrinseco, hanno sollevato la possibilità di implementare il tessuto nativo con cellule staminali adulte trapiantate. Questo approccio si è mostrato ripetutamente capace di ristabilire il microambiente discale, portando a rigenerazione del tessuto. Tuttavia, sono necessari maggiori sforzi per valutare l'efficacia di una terapia basata su cellule staminali adulte per trattare la degenerazione del disco intervertebrale in *trial* clinici su larga scala. Il trapianto di MSC si è dimostrato promettente e sicuro sia in modelli animali che in *trial* clinici, rendendo questo approccio uno strumento importante per trattare la degenerazione del disco intervertebrale nel prossimo futuro.

Bibliografia

1. Vadala G, Russo F, Di Martino A, Denaro V. Intervertebral disc regeneration: from the degenerative cascade to molecular therapy and tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(6):679-90.
2. Roughley PJ, Melching LI, Heathfield TF, Pearce RH, Mort JS. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006;1:S326-32. Suppl. 3.
3. Boni M, Denaro V. *Anatomo-clinical correlations in cervical spondylosis*. In: Kehr P, Weidner A (Ed.). *Cervical Spine I*. Springer: Berlino; 1987. p. 3-20.
4. Vadala G, Russo F, Ambrosio L, Di Martino A, Papalia R, Denaro V. Biotechnologies and biomaterials in spine surgery. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29:137-47. Suppl. 4.
5. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, Kompel JF, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine J* 2005;5(1):14-23.
6. Gruber HE, Hanley EN, Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 1998;23(7):751-57.
7. Papalia R, Di Pino G, Tecame A, Vadala G, Formica D, Di Martino A, Albo E, Di Lazzaro V, Denaro V. Biomechanical and neural changes evaluation induced by prolonged use of non-stable footwear: a systematic review. *Musculoskelet Surg* 2015;99(3):179-87.
8. Ganey T, Libera J, Moos V, Alasevic O, Fritsch KG, Meisel HJ, Hutton WC. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine* 2003;28(23):2609-20.
9. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003;24(20):3531-41.

10. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng* 2007;24(1):5-21.
11. Nukaga T, Sakai D, Tanaka M, Hiyama A, Nakai T, Mochida J. Transplantation of activated nucleus pulposus cells after cryopreservation: efficacy study in a canine disc degeneration model. *Eur Cell Mater* 2016;31:95-106.
12. Vadala G, Russo F, Ambrosio L, Loppini M, Denaro V. Stem cells sources for intervertebral disc regeneration. *World J Stem Cells* 2016;8(5):185-201.
13. Noriega DC, Ardura F, Hernandez-Ramajo R, Martin-Ferrero MA, Sanchez-Lite I, Toribio B, Alberca M, Garcia V, Moraleda JM, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 2017;101(8):1945-51.
14. Cunha C, Almeida CR, Almeida MI, Silva AM, Molinos M, Lamas S, Pereira CL, Teixeira GQ, Monteiro AT, Santos SG, Goncalves RM, Barbosa MA. Systemic delivery of bone marrow mesenchymal stem cells for in situ intervertebral disc regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(3):1029-39.
15. Vadala G, Studer RK, Sowa G, Spiezia F, Iucu C, Denaro V, Gilbertson LG, Kang JD. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33(8):870-6.
16. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008;8(6):888-96.
17. Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, Liebenberg E, Alliston T, Gartner ZJ, Lotz JC. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D coculture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2017;35(1):61-73.
18. Shim EK, Lee JS, Kim DE, Kim SK, Jung BJ, Choi EY, Kim CS. Autogenous mesenchymal stem cells from the vertebral body enhance intervertebral disc regeneration by paracrine interaction: an *in vitro* pilot study. *Cell Transplant* 2016;25(10):1819-832.
19. Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J, Mauck WD, Shelerud RA, Maus TP, Yang TH, Murad MH, Gou S, Terry MJ, Dauffenbach JP, Pingree MJ, Eldrige JS, Mohammed K, Benkhadra K, van Wijnen AJ, Qu W. Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells—a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene* 2015;564(1):1-8.
20. Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, Rosenfeld JV, Jenkin G. Cell-Based Therapies Used to Treat Lumbar Degenerative Disc Disease: A systematic review of animal studies and human clinical trials. *Stem Cells Int* 2015;2015:946031.
21. Maidhof R, Rafiuddin A, Chowdhury F, Jacobsen T, Chahine NO. Timing of mesenchymal stem cell delivery impacts the fate and therapeutic potential in intervertebral disc repair. *J Orthop Res* 2017;35(1):32-40.
22. Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6(5):348-55.
23. Vadala G, Russo F, Pattappa G, Schiuma D, Peroglio M, Benneker LM, Grad S, Alini M, Denaro V. The transpedicular approach as an alternative route for intervertebral disc regeneration. *Spine* 2013;38(6):E319-24.
24. Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011;92(7):822-8.
25. Elabd C, Centeno CJ, Schultz JR, Lutz G, Ichim T, Silva FJ. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a long-term safety and feasibility study. *J Transl Med* 2016;14:253.