

Il collagene di tipo I ad uso infiltrativo nel trattamento delle patologie muscoloscheletriche

Federico GIARDA¹, Andrea PARENTE², Fabrizio GERVASONI³, Antonio ROBECCHI MAJNARDI⁴

¹ U.O. Medicina Riabilitativa e Neuroriabilitazione, ASST GOM Niguarda, Milano

² Scuola di Specializzazione Medicina Fisica e Riabilitativa, Università degli Studi di Milano

³ U.O. Riabilitazione Specialistica, Ospedale "Luigi Sacco", ASST Fatebenefratelli Sacco, Milano

⁴ Dipartimento di Scienze Neuroriabilitative, IRCCS, Istituto Auxologico Italiano, Milano

Introduzione

Il collagene è un biopolimero glicoproteico strutturale, tra i più diffusi nei tessuti connettivi animali; nell'uomo rappresenta il 25-30% di tutte le proteine e il 5-6% della massa totale. Esso è costituito da tre catene polipeptidiche, chiamate catene α , avvolte a formare una tripla elica. La struttura è caratterizzata dalla presenza di glicina ogni terzo residuo, da un alto contenuto di prolina e idrossiprolina, ed è stabilizzata da legami idrogeno intercatena e interazioni elettrostatiche (figura 1). Questa architettura conferisce alla molecola alta resistenza meccanica, incomprimibilità e contemporaneamente estensibilità, plasticità e flessibilità, rendendo particolarmente resistenti alle sollecitazioni e al carico i tessuti in cui è abbondante [1]. Nell'uomo il collagene è presente in particolare a livello di cute, sottocute, tendini, muscoli, legamenti, capsula articolare, cartilagine e osso [2; 3; 4]. Il picco di biosintesi collagenica avviene tra i 40 e i 60 anni di età, successivamente si verifica una rapida riduzione della stessa, controllata da geni che codificano per le Metalloproteasi della Matrice (MMPs). Le MMPs svolgono un ruolo centrale nel tessuto connettivo in condizioni fisiologiche ma sono altresì implicate in fenomeni patologici quando prevalgono sugli Inibitori Tissutali delle Metallo-Proteinasi (TIMPs) [5]. Lo squilibrio tra i processi di degradazione e sintesi di collagene, influenzato da citochine

proinfiammatorie, citochine antinfiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS), è responsabile del progressivo indebolimento istologico e funzionale delle strutture dell'appa-

rato locomotore prevalentemente costituite da questa proteina. Questo fenomeno è particolarmente evidente a livello del tendine, le cui proprietà meccaniche sono fortemente

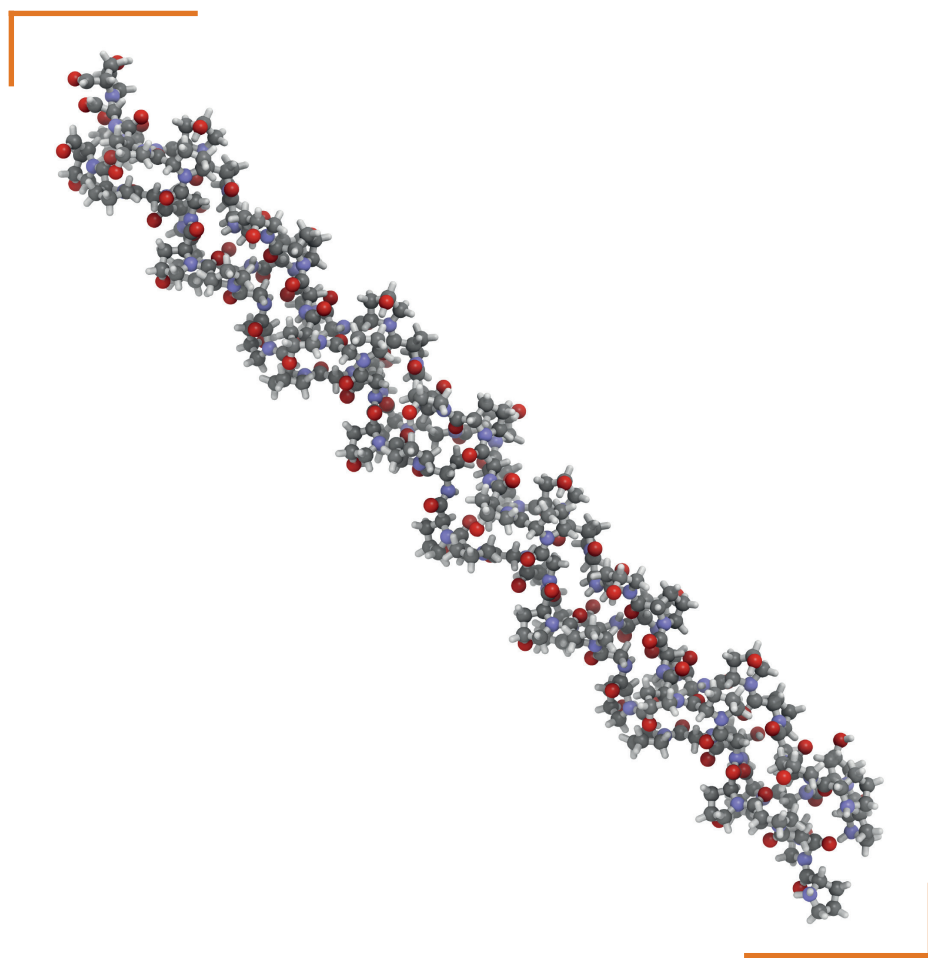


Figura 1 L'unità strutturale del collagene è il tropocollagene, proteina formata da tre catene polipeptidiche con andamento sinistrorso, avvolte a formare una tripla elica destrorsa. La sequenza di aminoacidi che compongono ogni catena è caratterizzata dalla presenza di glicina (Gly) ogni tre residui mentre le restanti posizioni sono occupate in particolare da prolina (Pro) e idrossiprolina (Hyp). Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005;70:301-39.

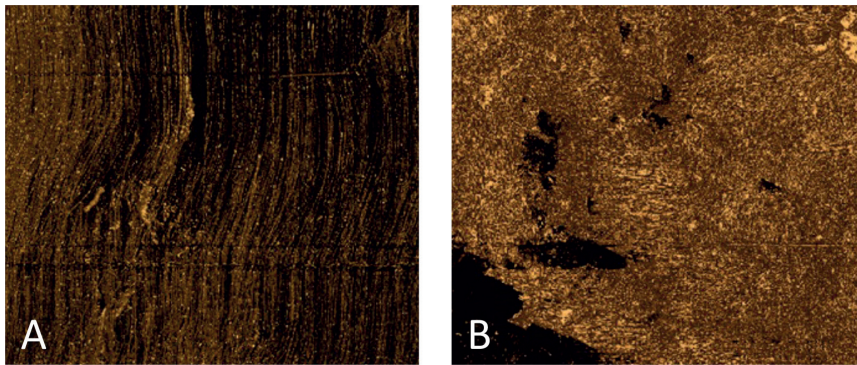


Figura 2 Cambiamenti nell'organizzazione nelle regioni sane e tendinopatiche dello stesso tendine. Il tendine sano (A) mostra un allineamento quasi parallelo delle fibrille di collagene. Il tendine patologico (B) presenta MEC disorganizzata. Tratto da: Pingel J, Lu Y, Starborg T, Fredberg U, Langberg H, Nedergaard A, Weis M, Eyre D, Kjaer M, Kadler KE. 3-D ultrastructure and collagen composition of healthy and overloaded human tendon: evidence of tenocyte and matrix buckling. *J Anat.* 2014 May;224(5):548-55.

influenzate dalla composizione della matrice extracellulare (ECM), costituita principalmente da collagene di tipo I che rappresenta il 70-80% del peso secco del tendine e quasi il 95% del collagene totale [6; 7; 8]. Le principali caratteristiche istologiche e molecolari delle tendinopatie includono: disorganizzazione delle fibre di collagene, aumento della vascolarizzazione e dell'innervazione sensitiva, squilibrio dell'omeostasi della ECM con aumento dei componenti non collagenici, aumento delle cellule immunitarie e dei mediatori dell'infiammazione, aumentata apoptosi cellulare [9; 10]. È stato dimostrato come l'insorgenza di tendinopatia si associ al fallimento delle normali risposte omeostatiche con conseguente riduzione di collagene I (COL-I) e aumento di collagene III che viene depositato irregolarmente e risulta meno in grado di garantire le caratteristiche anatomiche e funzionali tipiche del tendine sano (**figura 2**). Ne consegue una ridotta tolleranza al carico e una maggior propensione al danno [10; 11].

Da questi presupposti nasce il razionale di utilizzo del collagene tipo I ad uso infiltrativo. Le catene proteiche costituenti il collagene sono difficilmente sintetizzabili in laboratorio, ad oggi esso viene estratto da tessuti animali, quali ad esempio il derma suino da cui può essere ottenuto un prodotto con elevata omologia con quello umano, elevata biocompatibilità e privo di potenziale allergenico [12; 13; 14].

Evidenze in vitro

Fondamentale supporto all'evidenza di utilizzo del collagene infiltrativo è stato apportato dal lavoro di Randelli F. e collaboratori del 2018 in cui l'effetto in vitro di preparati a base di collagene di tipo I sotto forma di medical device di classe III iniettabili è stato studiato su tenociti umani ottenuti da frammenti di tendine del piccolo gluteo sano. Sono state studiate la proliferazione e la migrazione cellulare rispettivamente mediante curve di crescita e analisi di guarigione della ferita. L'espressione di geni e proteine coinvolti nel turnover del collagene è stata analizzata mediante tecniche di biologia molecolare (real-time PCR, Slot blot e SDS-zimografia). Il dispositivo medico a base di collagene suino di tipo I è risultato in grado di indurre la proliferazione e la migrazione dei tenociti verso il sito di lesione e di indurre in essi un fenotipo anabolico stimolando la sintesi, la maturazione e la secrezione di COL-I. L'utilizzo di questo approccio si propone quindi potenzialmente in grado di favorire l'omeostasi e la riparazione del tendine agendo come bio-scaffold [15].

In condizioni fisiologiche, il collagene neosintetizzato subisce una reticolazione (cross-link), ad opera di enzimi quali la lisil-idrossilasi 2 (LH2b), fondamentale per la stabilizzazione delle fibrille di collagene e per fornire resistenza al tendine [16; 17]. Il collagene infiltrativo si è dimostrato in grado di stimolare la sintesi di

COL-I e di aumentare i livelli di mRNA dell'inibitore tissutale delle metalloproteinasi della matrice -1 (TIMP-1). Contemporaneamente, la lisil-idrossilasi 2b (LH2b) e le metalloproteinasi della matrice 1 e 2, coinvolte rispettivamente nella maturazione e degradazione del collagene, non sono risultate influenzate. Questo risultato supporta l'ipotesi che il collagene tipo I infiltrativo sia in grado di stimolare la secrezione di collagene da parte dei tenociti inducendo in essi un fenotipo anabolico [15].

I risultati di un successivo studio in vitro Randelli F. e coll. del 2020 confermano che questo approccio terapeutico influenza le vie di turnover del collagene, migliora la formazione di adesioni focali e favorisce la migrazione cellulare, mostrando come l'effetto indotto dal COL-I infiltrativo rappresenti un input che coinvolge i fenomeni di meccano-trasduzione, proponendosi quindi come bio-scaffold ad azione riparativa e rigenerativa [18].

Evidenze cliniche

Dalla loro commercializzazione sono stati condotti molteplici studi clinici, su riviste indicizzate e non, riguardanti l'utilizzo di COL-I ad uso infiltrativo con risultati promettenti in ambito muscoloscheletrico [8]. Di seguito sono riportate le principali evidenze di utilizzo in ambito clinico.

Epicondilita laterale

Corrado B. e collaboratori hanno testato l'efficacia, a uno (T1) e a tre mesi (T2), di una serie di 5 iniezioni, a intervallo settimanale, su 50 pazienti affetti da epicondilita laterale da almeno 6 mesi. Le iniezioni sono state effettuate mediante tecnica palpatoria a livello dell'inserzione prossimale degli estensori di polso e dita sull'epicondilo omerale laterale (**figura 3**). In questo lavoro, ad entrambi i follow up, è stato osservato un miglioramento statisticamente significativo in termini di dolore e funzione, quantificati mediante Patient-Rated Tennis Elbow Evaluation (PRTEE) questionnaire. In particolare, tra T0 e T1, è stato osservato un miglioramento delle variabili analizzate con riduzione dei rispettivi



Figura 3 Infiltrazione mediante tecnica palpatoria a livello del punto di maggior dolorabilità in prossimità dell'epicondilo omerale laterale, sede di inserzione del tendine comune degli estensori.

punteggi del 55% e 58%. Tali risultati si sono ulteriormente consolidati a T2 con riduzione del punteggio del dolore del 68,9% e del punteggio relativo alla funzione del 63,2% rispetto al T0, corrispondenti al 66,1% del punteggio totale, in assenza di eventi avversi [19]. Un miglioramento statisticamente significativo della sintomatologia dolorosa è stato osservato anche in pazienti affetti da epicondilite cronica refrattaria ad altri trattamenti e trattati con collagene infiltrativo associato a stretching ed esercizio eccentrico [20].

Spalla dolorosa

L'utilizzo di collagene infiltrativo è stato testato su molteplici affezioni dolorose della spalla. Variazioni statisticamente significative sono state osservate nella gestione della tendinopatia cronica del sovraspinato, in termini di riduzione del dolore e miglioramento della funzione valutata mediante Constant-Murley e questionario DASH. In questo caso i pazienti arruolati sono stati trattati con una serie di 4 infiltrazioni ecoguidate di COL-I a cadenza settimanale, in prossimità dell'area più ipoecogena/anecogena del tendine [21]. Altri lavori, hanno testato l'utilizzo di collagene in pazienti affetti da lesione parziale del sovraspinato,

da tendinopatia calcifica della cuffia dei rotatori e nel trattamento della spalla dolorosa nel paziente emiplegico, riportando riduzione della sintomatologia dolorosa, miglioramento funzionale e della qualità di vita percepita, in assenza di effetti collaterali [22, 23].

Fascite plantare

In uno studio pilota, condotto su 16 corridori affetti da fasciopia plantare da almeno 6 mesi, sono state effettuate una serie di 4 infiltrazioni ecoguidate di collagene I ad intervalli settimanali. I risultati hanno mostrato al follow-up a 3 mesi un miglioramento statisticamente significativo del dolore (VAS) e della funzionalità (AOFAS-AH) [24]. La riduzione del 38,5% osservata al punteggio VAS è comparabile a risultati ottenuti in un precedente lavoro di Kim e coll., in cui il collagene ad uso infiltrativo si è inoltre dimostrato efficace nell'aumentare l'elasticità della fascia plantare valutata mediante elastosonografia [25].

Osteoartrosi

L'osteoartrosi (OA) è una delle principali cause di disabilità ed è caratterizzata da alterazioni che possono coinvolgere in misura variabile le strutture

articolari e periarticolari [26]. L'utilizzo di collagene infiltrativo è stato proposto nel trattamento dell'osteoartrosi con l'intento di limitare l'ipermobilità articolare, stabilizzare la struttura delle componenti articolari e periarticolari, ridurre il dolore e conseguentemente migliorare la funzione. In uno studio randomizzato, in doppio cieco, prospettico, condotto su 60 pazienti con gonartrosi sintomatica (Kellgren-Lawrence grado 2-3), è stata confrontata l'efficacia di acido ialuronico e collagene tipo I mediante una serie di 5 infiltrazioni intra-articolari a cadenza settimanale. Funzione, dolore e qualità di vita sono state valutate utilizzando rispettivamente Lequesne Knee Index (LKI), Visual Analogue Scale (VAS) e il questionario SF-36. Al follow up a 3 e a 6 mesi, i valori associati a LKI e VAS hanno evidenziato un significativo miglioramento in entrambi i gruppi rispetto al T0, senza differenze statisticamente significative tra i due approcci. Entrambe le opzioni farmacologiche sono infatti risultate ugualmente efficaci nel ridurre i sintomi dell'OA del ginocchio a 6 mesi dall'inizio del trattamento, mostrando un profilo di sicurezza soddisfacente in considerazione della tollerabilità sia a livello locale che sistemico [27].

Un ulteriore trial clinico, prospettico, randomizzato, ha confrontato l'efficacia di una serie di 5 infiltrazioni intra-articolari di acido ialuronico e COL-I confermato la riduzione del dolore (VAS) e il miglioramento della funzionalità in pazienti affetti da gonartrosi (Kellgren-Lawrence grado 2-3) con una differenza statisticamente non significativa tra i due gruppi ($p > 0,05$) nel breve e medio termine (12 settimane) [28]. Infine risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche mediante somministrazione periarticolare in pazienti con gonartrosi avanzata (III-IV stadio) [29].

Per quanto riguarda l'articolazione dell'anca, l'infiltrazione intra-articolare di collagene di tipo I è risultata efficace nel ridurre il dolore e migliorare la funzione in pazienti affetti da coxartrosi (Kellgren-Lawrence I e II), con beneficio superiore a 3 mesi [30; 31]. In questa sede alcuni autori suggeriscono l'utilizzo di collagene di tipo I a livello peri e intrarticolare, in aggiunta ad acido ialuronico intrarticolare, al



Figura 4 Infiltrazione articolare e periarticolare dell'articolazione trapezio-metacarpale.

fine di ottenere un miglioramento più significativo e duraturo del dolore, dell'articolazione globale dell'anca e, in particolare, della sua funzionalità [32].

Infine, l'impiego di collagene tipo I a livello articolare e periarticolare è stato studiato nel trattamento della rizoartrosi sintomatica con evidenza di efficacia nel controllo della sintomatologia dolorosa, nel miglioramento della funzione e nella riduzione dell'instabilità articolare (**figura 4**) [33].

Dolore mio-fasciale

Le interazioni tra cellule muscolari e matrice extracellulare svolgono un ruolo chiave nei processi riparativi a carico del tessuto muscolare, specie quando quest'ultimo è sottoposto a stress meccanici. Alterazioni quantitative o qualitative del collagene a livello della MEC possono divenire causa di inappropriata rigenerazione muscolare favorendo o sostenendo processi patologici [34]. La sindrome del dolore miofasciale è una condizione dibattuta in letteratura, caratterizzata da dolore cronico e dalla presenza di uno o più trigger points miofasciali, punti dolorosi ipereccitabili con coinvolgimento di un numero limitato di fibre

muscolari [35]. Alla base dell'insorgenza del dolore miofasciale, alcuni autori hanno ipotizzato un danno muscolare associato a ipossia locale derivante da aumentato metabolismo cellulare, diminuzione della circolazione capillare e deficitaria produzione di ATP [36; 37; 38]. Järvholm e collaboratori hanno rilevato che l'aumento di pressione intramuscolare a livello dei trigger points comporterebbe diminuzione del flusso ematico locale e, di conseguenza, ischemia [39]. Molteplici trattamenti sono stati proposti per il trattamento del dolore miofasciale [36], tra questi la rigenerazione guidata da biomateriali può rappresentare un nuovo approccio terapeutico: evidenze hanno dimostrato che l'iniezione di una matrice di collagene potenziata con un tetrasaccaride sia in grado di indurre rivascularizzazione e rigenerazione della muscolatura scheletrica attraverso la differenziazione delle cellule pluripotenti verso la linea miogenica [40].

In uno studio randomizzato, controllato, in singolo cieco è stato testato l'utilizzo di collagene tipo I ad uso infiltrativo nel trattamento del dolore miofasciale, confrontandolo con l'iniezione intramuscolare di lidocaina e di soluzione fisiologica. Nei 43 pazienti

arruolati, sintomatici per dolore miofasciale a livello del muscolo massetere, è stato valutato il beneficio dei trattamenti infiltrativi in termini di variazione della sintomatologia dolorosa (VAS) e dell'attività muscolare quantificata mediante elettromiografia di superficie. In tutti i gruppi sono stati raggiunti risultati statisticamente significativi per entrambe le variabili analizzate tuttavia i miglioramenti più consistenti sono stati osservati nel sottogruppo trattato con collagene che si propone come valida alternativa a trattamenti sostenuti da maggiori evidenze [41].

In conclusione, le evidenze ad oggi disponibili propongono il collagene tipo I ad uso infiltrativo come un approccio sicuro e con risultati promettenti nel trattamento del dolore e nel recupero funzionale in ambito muscoloscheletrico. Gli studi di fase preclinica citati nel testo hanno permesso di comprendere meglio i meccanismi d'azione, tuttavia sono necessari ulteriori studi clinici per definire con maggior precisione indicazioni e limiti della metodica.

Bibliografia

1. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.
2. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci.* 2007 Jun 15;120(Pt 12):1955-8.
3. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):247-57.
4. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jan 1;3(1):a004978.
5. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.
6. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):423-8.
7. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J. Med. Sci Sports* 2000, 10, 312-320.
8. Milani L. Guna Collagen Medical Devices 10 years on - A reasoned analysis of 2 recent important studies and literature. *Physiological regulating Medicine* 2019-2020; 3-18.
9. Müller SA, Todorov A, Heisterbach PE, Martin I, Majewski M. Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and syste-

- matic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Jul;23(7):2097-105.
10. Millar NL, Silbernagel KG, Thorborg K, Kirwan PD, Galatz LM, Abrams GD, Murrell GAC, McInnes IB, Rodeo SA. Tendinopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Jan 7;7(1):1.
 11. Xu Y, Murrell GA. The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Jul;466(7):1528-38.
 12. Tanrikulu IC, Forticaux A, Jin S, Raines RT. Peptide tessellation yields micrometre-scale collagen triple helices. *Nat Chem.* 2016 Nov;8(11):1008-1014.
 13. Fields GB. Synthesis and biological applications of collagen-model triple-helical peptides. *Org Biomol Chem.* 2010 Mar 21;8(6):1237-58.
 14. Schmitt E, Tanrikulu IC, Yoo TH, Panvert M, Tirrell DA, Mechulam Y. Switching from an induced-fit to a lock-and-key mechanism in an aminoacyl-tRNA synthetase with modified specificity. *J Mol Biol.* 2009 Dec 18;394(5):843-51.
 15. Randelli F, Menon A, Gai Via A, Mazzoleni MG, Sciancalepore F, Brioschi M, Gagliano N. Effect of a Collagen-Based Compound on Morpho-Functional Properties of Cultured Human Tenocytes. *Cells.* 2018 Dec 6;7(12):246.
 16. Silver, F.H.; Christiansen, D.; Snowhill, P.B.; Chen, Y.; Landis, W.J. The role of mineral in the storage of elastic energy in turkey tendons. *Biomacromolecules* 2000, 1, 180–185.
 17. Walker, L.C.; Overstreet, M.A.; Yeowell, H.N. Tissue-specific expression and regulation of the alternatively-spliced forms of lysyl hydroxylase 2 (LH2) in human kidney cells and skin fibroblasts. *Matrix. Biol.* 2005, 23, 515–523.
 18. Randelli F, Sartori P, Carlomagno C, Bedoni M, Menon A, Vezzoli E, Sommariva M, Gagliano N. The Collagen-Based Medical Device MD-Tissue Acts as a Mechanical Scaffold Influencing Morpho-Functional Properties of Cultured Human Tenocytes. *Cells.* 2020 Dec 8;9(12):2641.
 19. Corrado B, Mazzuoccolo G, Liguori L, Chirico VA, Costanzo MD, Bonini I, Bove G, Curci L. Treatment of Lateral Epicondylitis with Collagen Injections: a Pilot Study. *Muscle Ligaments and Tendons Journal.* 2019;9(4):584-589.
 20. Hernandez Herrero D. Value of pain and satisfaction after treatment with subcutaneous collagen in patients with epicondylitis refractory to other treatments. *Physiological Regulating Medicine,* 2020; 19-25.
 21. Corrado B, Bonini I, Chirico VA, Filipini E, Liguori L, Magliulo G, Mazzuoccolo G, Rosano N, Gisonni P. Ultrasound-guided collagen injections in the treatment of supraspinatus tendinopathy: a case series pilot study. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2020 May-Jun;34(3 Suppl. 2):33-39.
 22. Milano E. MD- Shoulder in the integrated rehabilitation treatment of shoulder pain in post-stroke hemiplegic patients. *Physiological Regulating Medicine,* 2021; 31-35.
 23. Zurita Uroz N. Collagen medical device infiltrations in shoulder pathologies. Calcific supraspinatus tendinitis. *Physiological Regulating Medicine* 2016-2017, 35-37.
 24. Corrado B, Bonini I, Tarantino D, Sirico F. Ultrasound-guided collagen injections for treatment of plantar fasciopathy in runners: A pilot study and case series. *Journal of Human Sport and Exercise.* 2020 15(3proc), S793-S805.
 25. Kim M, Choi YS, You MW, Kim JS, Young KW. Sonoelastography in the Evaluation of Plantar Fasciitis Treatment: 3-Month Follow-Up After Collagen Injection. *Ultrasound Q.* 2016 Dec;32(4):327-332.
 26. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759.
 27. Martin Martin LS, Massafra U, Bizzi E, Migliore A. A double blind randomized active-controlled clinical trial on the intra-articular use of Md-Knee versus sodium hyaluronate in patients with knee osteoarthritis ("Joint"). *BMC Musculoskelet Disord.* 2016 Feb 22;17:94.
 28. Nguyen Vinh N. Initial assessment of effectiveness of intra-articular MD-Knee injection therapy in treatment of primary knee osteoarthritis. *Physiological Regulating Medicine.* 2020, 27-31.
 29. Nestorova R, Rashkov R, Reshkova V, Kapandjieva N. Efficiency of collagen injections of GUNA MD in patients with gonarthrosis, assessed clinically and by ultrasounds. *Physiological Regulating Medicine.* 2012, 37-39.
 30. Tivchev P. Ortopediya i Travmatologiya (Bulgarian Journal of Orthopedics and Trauma), 2012/3, vol. 49; 123-128.
 31. Giovannangeli F. Intra articular administration of MD HIP in 24 patients affected by symptomatic hip osteoarthritis - a 24-month cohort study. *Physiological Regulating Medicine,* 2017; 31-32.
 32. Milano E. The role of MD-Hip in the ultrasound-guided infiltrative therapy for hip osteoarthritis. *Physiological Regulating Medicine,* 2018; 3-8.
 33. Brunato F. The treatment of rhizoarthrosis with collagen medical device small joints. *Physiological Regulating Medicine,* 2021; 3-12.
 34. Thorsteinsdóttir S, Deries M, Cachaço AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2011 Jun 15;354(2):191-207.
 35. Travell JG, Simons DG. *Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.
 36. Barbero M, Schneebeli A, Koetsier E, Maino P. Myofascial pain syndrome and trigger points: evaluation and treatment in patients with musculoskeletal pain. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2019 Sep;13(3):270-276.
 37. Han SC, Harrison P. Myofascial pain syndrome and trigger-point management. *Reg Anesth.* 1997 Jan-Feb;22(1):89-101.
 38. Sikdar S, Shah JP, Gebreab T, Yen RH, Gilliams E, Danoff J, Gerber LH. Novel applications of ultrasound technology to visualize and characterize myofascial trigger points and surrounding soft tissue. *Arch Phys Med Rehabil.* 2009 Nov;90(11):1829-38).
 39. Järholm U, Styf J, Suurkula M, Herberts P. Intramuscular pressure and muscle blood flow in supraspinatus. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1988;58(3):219-24.
 40. Kuraitis D, Ebadi D, Zhang P, Rizzuto E, Vulesevic B, Padavan DT, Al Madhoun A, McEwan KA, Sofrenovic T, Nicholson K, Whitman SC, Mesana TG, Skerjanc IS, Musarò A, Ruel M, Suuronen EJ. Injected matrix stimulates myogenesis and regeneration of mouse skeletal muscle after ischaemic injury. *Eur Cell Mater.* 2012 Sep 12;24:175-95; discussion 195-6.
 41. Nitecka-Buchta A, Walczynska-Dragon K, Batko-Kapustecka J, Wieckiewicz M. Comparison between Collagen and Lidocaine Intramuscular Injections in Terms of Their Efficiency in Decreasing Myofascial Pain within Masseter Muscles: A Randomized, Single-Blind Controlled Trial. *Pain Res Manag.* 2018 Jun 3;2018:8261090.