

A. Marmotti¹
G. Peretti^{2,3}
S. Mattia¹
L. Mangiavini^{2,3}
E. Bellato¹
L. de Girolamo²
G. Agati¹
D.E. Bonasia¹
S. Setti⁴
F. Castoldi¹

¹ University of Turin, Department of Orthopaedics and Traumatology, Turin, Italy; ² IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milan, Italy; ³ Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Milan, Italy; ⁴ IGEA SpA Clinical Biophysics, Carpi, Modena, Italy

Indirizzo per la corrispondenza:

Antonio Marmotti

Department of Orthopaedics and Traumatology, University of Turin, Turin, Italy; San Luigi Gonzaga Hospital, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano, Turin, Italy

antonio.marmotti@inwind.it

Le basi del futuro

The premises for the future

Riassunto

Nel trattamento delle patologie articolari della caviglia, la conservazione dell'anatomia è il primo requisito fondamentale, in relazione alla peculiare distribuzione del carico sulla superficie cartilaginea. Gli elementi che costituiscono le basi future per le terapie biologiche sono le cellule staminali mesenchimali, le energie biofisiche come i campi magnetici pulsati, gli scaffold "intelligenti", i fattori di crescita come il G-CSF e il secretoma delle cellule staminali.

Parole chiave: caviglia, cartilagine, cellule staminali, campi magnetici, secretoma

Summary

Integrity of the anatomy of the ankle is a prerequisite of each innovative therapy for bone and cartilage reconstruction, due to the peculiar load transfer on the articular surfaces of the ankle joint. The fundamental topics for the future development of regenerative therapies are the mesenchymal stem cells, the biophysical stimuli as the pulsed electromagnetic fields, the "smart scaffolds", the growth factors as the G-CSF and the stem cell secretoma.

Key words: ankle, cartilage, stem cells, pulsed electromagnetic fields, secretoma

In uno sguardo verso le attuali proposte terapeutiche rigenerative articolari, il punto di partenza è la considerazione della struttura cartilaginea della caviglia che, a differenza del "contro-altare" rappresentato dal ginocchio, è da tempo considerata un'articolazione più tollerante. Questo dipende essenzialmente dalla struttura peculiare della tibiotarsica che, ad anatomia intatta, mostra in carico una superficie di contatto (contact area) molto maggiore del ginocchio, per cui la "congruenza" delle superfici nella caviglia è maggiore, con conseguente distribuzione del carico intuitivamente (e biomeccanicamente) molto più omogenea. Questa anatomia conduce ad una deformazione in carico della cartilagine della caviglia molto ridotta rispetto al ginocchio e all'assioma "ad alta congruenza articolare corrisponde spessore cartilagineo ridotto"; infatti lo spessore dello strato cartilagineo è di circa 1,1 mm nell'astragalo rispetto ai 2,2 mm del condilo femorale ad esempio¹. Questo complesso di anatomia e biomeccanica rende la caviglia più prona ad una risposta riparativa e più tollerante nei confronti delle lesioni cartilaginee con una minore prevalenza dell'osteoartrosi sintomatica rispetto al ginocchio.

Pertanto, le lesioni osteocondrali nella caviglia (prevalentemente astragaliche in sede anterolaterale o posteromediale e raramente "idiopatiche" perché più spesso collegate ad eventi traumatici) possono rimanere silenti in relazione alla biomeccanica articolare² ed iniziano ad essere sintomatiche quando il coinvolgimento lesionale dell'osso subcondrale diventa presente con la formazione progressiva di cisti ossee subcondrali per deflusso di liquido articolare a partire dalla lesione cartilaginea, con un meccanismo che ricorda il meccanismo "a valvola" e che genera osteolisi per aumento pressorio locale. L'aumento pressorio nell'osso subcondrale stimola progressivamente le fibre nervose presenti in gran numero nella struttura ossea subcondrale e in questa maniera si crea lo stimolo percepito del "dolore articolare profondo" tipico delle lesioni osteocondrali talari che diventano sintomatiche². Un circolo vizioso, poi, si crea tra osso e cartilagine poiché l'osso, alterato dalla presenza della cisti, non supporta più la sovrastante struttura cartilaginea che

progressivamente degenera, aumentando, dal canto suo, le sollecitazioni sull'osso e, di conseguenza, l'aumento di volume delle cavità cistiche osteolitiche subcondrali.

La gradualità di questo meccanismo lesionale “funziona” in presenza di integrità anatomica. Infatti, è proprio l'integrità anatomica della caviglia ad essere un “secondo” punto di partenza su cui costruire le basi per ogni futura terapia innovativa. Infatti, in caso di malallineamento secondario a frattura, avviene una importante diminuzione della “congruenza” articolare con sottrazione del carico in alcune regioni articolari e immediato aumento del carico nelle altre zone che, per la deformità post fratturativa, sono sottoposte al carico; si è calcolato che per 1 mm shift laterale dell'astragalo si riduce l'area di contatto tra tibia e astragalo del 42%, mentre per 2 mm tale area è ridotta del 56%³. Ecco perché 2 mm di shift laterale dell'astragalo costituiscono una indicazione a correzione chirurgica della riduzione, che altrimenti lascerebbe la caviglia ad alto rischio disviluppare artrosi post-traumatica per la deformità residua data dal malallineamento².

Pertanto le basi di partenza per una terapia biologica nella caviglia sono sicuramente:

- 1 l'integrità anatomica (o la sua correzione chirurgica);
- 2 il trattamento delle lesioni articolari (quando sintomatiche) considerando sia il versante cartilagineo sia quello dell'osso subcondrale; nel timing di questo step, la regola di Mats Brittberg delle “3 T” (time, tolerance and training, cioè “lasciare che il tempo ci dimostri la reale sintomaticità”, “insegnare al paziente un margine di tolleranza” e “insistere come prima linea con il trattamento incruento e fisioterapico”) è quanto mai ancora attuale.

In questo orizzonte, gli elementi costitutivi delle basi future più “appealing” per le terapie biologiche sono molteplici. Schematicamente si possono suddividere in:

- cellule mesenchimali (MSC), ormai intese come “fabbriche” (“factories”) di molecole bioattive anti-infiammatorie, trofiche per le cellule residenti, immunosoppressive e antifibrotiche (per cui potremmo chiamarle meglio “Medicinal Signaling Cells”) ^{4 5}; il loro uso iniettivo, anche in associazione a procedure correttive di malallineamento in artrosi di caviglia⁶, o la loro applicazione locale attraverso scaffold rappresentano ancora un orizzonte attuale e percorribile;
- energie biofisiche in grado di modificare il microambiente pericellulare delle cellule residenti (attivandole in senso anabolico);
- scaffold “intelligenti” in grado di guidare la riparazione locale mediante “homing” dei precursori cellulari residenti;
- fattori di crescita che, ad azione sistemica mediante somministrazione iniettiva, promuovono la mobilita-

zione di precursori CD 34+ (ematopoietici, che però possono differenziare in cellule della linea mesenchimale come gli osteoblasti)⁷ e, in misura minore, di precursori CD34- (MSC) che per “homing” possono raggiungere i siti di riparazione;

- secretoma delle MSC.

In ognuno di questi versanti, le novità sono costanti.

Fonti alternative di cellule mesenchimali iniettabili (o veicolabili in scaffold localmente) sono attualmente le più inaspettate. I condrociti nasali, attraverso gli studi di Andrea Barbero⁸ e Giuseppe Peretti⁹, stanno raggiungendo risultati promettenti nella rigenerazione della cartilagine e il paradigma “nose to knee” potrebbe presto suonare anche come “nose to ankle”, a condizione che la rigenerazione dello strato cartilagineo delle lesioni osteocondrali astragaliche sia associato al trattamento del gap osseo cistico sottolesionale quando presente, ad esempio mediante “sandwich technique modificata” come mostrato da Sadlik et al.¹⁰. Recentemente il gruppo di Saris ha evidenziato come una profondità alla RMN di 6,5 mm o più nel ginocchio è il limite oltre il quale è necessaria l'applicazione della “sandwich technique”¹¹; un valore anche minore (es. 5,5 mm) potrebbe essere considerato il “cut-off” per le lesioni osteocondrali astragaliche in relazione al differente spessore della cartilagine articolare. Anche l'associazione di MSC allogeneiche e condroni autologhi, secondo il paradigma di Saris, può rappresentare una promettente alternativa nella riparazione delle lesioni cartilaginee di difetti osteocondrali astragalici¹². Un recente lavoro del gruppo di Laura de Girolamo¹³, tuttavia, propone una fonte riparativa sorprendente alternativa alle MSC: le cellule cartilaginee derivate da cartilagine artrosica. Secondo il loro lavoro, cellule cartilaginee prelevate da aree di cartilagine integra (sana) appartenenti ad articolazioni artrosiche potrebbero, anche per il preconditionamento subito dal microambiente lesionale, essere interessanti agenti promuoventi la rigenerazione cartilaginea per l'immediata ed efficiente abilità condrogenica, il secretoma ricco in fattori anabolici e pro-condrogenici e le proprietà anti-infiammatorie e immunomodulatorie. L'uso allogeneico di questa sorgente cellulare è il “next logical step” di un lavoro in vitro così innovativo. Anche i frammenti di cartilagine rappresentano una proposta innovativa per la riparazione cartilaginea, contenendo una popolazione di cellule che hanno caratteristiche simili ai precursori cartilaginei e alle cellule precursori dello strato superficiale della cartilagine e che sono in grado di migrare dai frammenti e colonizzare lo scaffold carrier e, di conseguenza, il tessuto lesionale circostante. Da alcuni anni sono stati studiati in vari modelli in vitro e preclinici sia in Italia dal gruppo di lavoro sinergico di Filippo Castoldi, Roberto Rossi e Giuseppe Peretti¹⁴⁻²⁰, sia più recentemente dal gruppo di Adachi in Giappone in

uno studio con frammenti inseriti in gel di atelocollagene sia in vitro ²¹ sia in modello preclinico in lesioni trocleari sul coniglio ²². Tra i nuovi candidati in ambito mesenchimale, però, un ruolo promettente è rivestito dalle cellule dello stroma cordonale. Le MSC da cordone ombelicale (UC-MS) sono in grado di differenziare in linee mesenchimali quali quella osteoblastica, condroblastica e tenoblastica. Una vasta letteratura è disponibile, sia per ciò che concerne studi in vitro ^{23 24} sia in forma di modelli preclinici su animali di grossa taglia come il cane ²⁵. E, in questo ambito, anche lo studio clinico pionieristico del gruppo polacco di Sadlik conferma la validità delle UC-MS come promotori della riparazione cartilaginea ²⁶.

Peraltro, proprio studi in vitro sulle UC-MS hanno dimostrato come sia possibile migliorare il differenziamento condrogenico ²⁷ e tenogenico ²⁴ mediante l'esposizione a campi magnetici pulsati (CEMP o PEMF). L'uso di energia biofisica, infatti, in forma di campi magnetici pulsati può essere una soluzione per interagire con il microambiente cellulare e i recettori alla superficie delle MS, condizionandone il percorso differenziativo in maniera non invasiva ed efficace. La "aspecificità" della azione del PEMF, la cui interazione sembra coinvolgere l'espressione di geni molto precoci nei processi differenziativi mesenchimali, rende i PEMF versatili nelle applicazioni in diversi "setting" riparativi: sarà infatti la composizione del microambiente circostante a determinare, di volta in volta, la direzione differenziativa delle MS in senso condrogenico o tenogenico o osteogenico, dopo che le cellule abbiano ricevuto il "burst" differenziativo aspecifico dei PEMF. Il gruppo di Laura de Girolamo è, in Italia, una voce molto autorevole in questo campo e nella recente review da loro pubblicata si evince come ogni tipo di MS (da midollo osseo, da tessuto adiposo, da tendine, da epitelio amniotico) può essere positivamente modulato mediante esposizione a PEMF o altri tipi di stimoli biofisici ²⁸.

Nell'orizzonte futuro, però, esistono anche altri panorami, quali l'uso di scaffold promuoventi la migrazione delle cellule staminali residenti. Lo studio di Lee et al. ²⁹, pubblicato ormai già nel 2010 su *Lancet*, aveva suggerito un paradigma affascinante in un modello preclinico su coniglio: la ricostruzione di una intera estremità articolare (omero prossimale) mediante scaffold veicolante TGF-beta3, con il quale si realizzava il meccanismo di "homing" delle MS residenti all'interno dello scaffold. A 4 mesi dall'impianto gli autori hanno osservato la presenza di cartilagine simil-alina alla superficie dello scaffold e osso subcondrale sottostante.

Il concetto di riparazione attraverso mobilitazione di cellule mesenchimali endogene è anche alla base dei trattamenti che applicano fattori di crescita quali il G-CSF, che, oltre ad un effetto trofico intrinseco, è in grado di aumen-

tare la mobilitazione sistemica di precursori staminali. Il trial clinico condotto dal Corrado Tarella e Paolo Rossi rappresenta la prima applicazione in vivo su uomo del G-CSF per promuovere la osteogenesi in pazienti ortopedici sani ³⁰ e, più recentemente, il lavoro di Zhao et al ha dimostrato la possibilità di ottenere la riparazione di lesioni osteocondrali in condili femorali del maiale mediante somministrazione di G-CSF associato ad un antagonista del recettore per le chemochine di tipo 4 (CXCR4 antagonist AMD3100), che aumenta la mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche. Nello studio di Zhao, le cellule mobilitate sono state veicolate direttamente nel sito di lesione mediante scaffold costituito da matrice ossea demineralizzata complessata con microsfele contenenti BMP-2 and TGF-beta3 ³¹. Anche il GM-CSF può essere un partner ottimale per aumentare i processi riparativi cartilaginei; in uno studio preclinico di Truong et al. su difetti trocleari del coniglio ³², la somministrazione endovenosa di GM-CSF ha migliorato significativamente la riparazione della lesione ottenuta con tecnica delle microfratture.

Infine, (last but not least), un altro percorso affascinante della ricerca attuale comprende l'uso del secretoma delle MS come strumento terapeutico, cioè la "terapia paracrina". Il vantaggio teorico immediato è facile da immaginare: in assenza di elementi cellulari, con la somministrazione del secretoma si eliminano tutte le perplessità etiche sulla genesi di teratomi da parte delle MS impiantate. Inoltre, il secretoma (più ancora delle MS allogeneiche) può essere considerato un prodotto terapeutico "off the shelf" e "ready to go" con notevole teorica semplificazione per gli usi futuri in vivo. La strada percorsa dalla ricerca in questo campo è già tanta. Ai lavori di Stella Cosenza del 2017 ³³, in cui veniva dimostrata l'efficacia del secretoma nella rigenerazione osteocartilaginea in modelli di artrosi nel topo, si affiancano già studi di altri gruppi di ricerca che, come Liu et al. ³⁴, hanno applicato scaffold di idrogel veicolanti esosomi in modelli preclinici di lesioni trocleari nel coniglio con risultati soddisfacenti, e studi come quello di Mao et al, che hanno concepito addirittura una modifica nel secretoma delle MS transfettando le MS con un microRNA coinvolto nella condrogenesi (miR-92a-3p) e ottenendo, così, esosomi "potenziati" (arricchiti in miR-92a-3p) capaci di indurre condrogenesi in modo molto più efficace dei secretomi nativi in un modello preclinico di artrosi nel topo. Il futuro, quindi, ci riserverà ancora sorprese strabilianti nelle terapie biologiche delle lesioni articolari, poiché i progressi nelle scienze di base hanno aperto spazi una volta inimmaginabili. Starà ad ognuno seguire i sentieri che più ritiene validi e applicare le nuove tecnologie, clinicamente, per il trattamento delle patologie della caviglia. Non bisogna tuttavia dimenticare che ogni applicazione di una nuova procedura richiede controllo costante dei dati e protocolli

di studio approvati dai comitati etici competenti. Solo così sarà possibile costruire un percorso scientifico aperto che possa portare la conoscenza, come nelle storie dell'astronave Enterprise, "where no one has gone before"³⁵.

Bibliografia

- 1 Shepherd DE, Seedhom BB. *Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb*. Ann Rheum Dis 1999;58:27-34. <https://doi.org/10.1136/ard.58.1.27>.
- 2 van Dijk CN, Reilingh ML, Zengerink M, et al. *Osteochondral defects in the ankle: why painful?* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2010;18:570-80. <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1064-x>.
- 3 Ramsey PL, Hamilton W. *Changes in tibiotalar area of contact caused by lateral talar shift*. J Bone Joint Surg Am 1976;58:356-7.
- 4 Caplan AI. *Mesenchymal stem cells: time to change the name!* Stem Cells Transl Med 2017;6:1445-51. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>.
- 5 El-Jawhari JJ, Brockett CL, Ktistakis I, et al. *The regenerative therapies of the ankle degeneration: a focus on multipotential mesenchymal stromal cells*. Regen Med 2018. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0104>.
- 6 Kim YS, Lee M, Koh YG. *Additional mesenchymal stem cell injection improves the outcomes of marrow stimulation combined with supramalleolar osteotomy in varus ankle osteoarthritis: short-term clinical results with second-look arthroscopic evaluation*. J Exp Orthop 2016;3:12. <https://doi.org/10.1186/s40634-016-0048-2>.
- 7 Chen JL, Hunt P, McElvain M, et al. *Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow*. Stem Cells Dayt Ohio 1997;15:368-77. <https://doi.org/10.1002/stem.150368>.
- 8 Mumme M, Barbero A, Miot S, et al. *Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial*. Lancet Lond Engl 2016;388:1985-94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31658-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31658-0).
- 9 Scotti C, Osmokrovic A, Wolf F, et al. *Response of human engineered cartilage based on articular or nasal chondrocytes to interleukin-1 β and low oxygen*. Tissue Eng Part A 2012;18:362-72. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0234>.
- 10 Sadlik B, Kolodziej L, Blasiak A, et al. *Biological reconstruction of large osteochondral lesions of the talar dome with a modified "sandwich" technique-Midterm results*. Foot Ankle Surg 2017;23:290-5. <https://doi.org/10.1016/j.fas.2016.09.001>.
- 11 Nizak R, Bekkers J, de Jong PA, et al. *Osteochondral lesion depth on MRI can help predict the need for a sandwich procedure*. Eur J Radiol 2017;90:245-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2017.03.007>.
- 12 de Windt TS, Vonk LA, Slaper-Cortenbach ICM, et al. *Allogeneic MSCs and recycled autologous chondrons mixed in a one-stage cartilage cell transplantation: a first-in-man trial in 35 patients*. Stem Cells Dayt Ohio 2017;35:1984-93. <https://doi.org/10.1002/stem.2657>.
- 13 De Luca P, Kouroupis D, Viganò M, et al. *Human diseased articular cartilage contains a mesenchymal stem cell-like population of chondroprogenitors with strong immunomodulatory responses*. J Clin Med 2019;8. <https://doi.org/10.3390/jcm8040423>.
- 14 Bonasia DE, Marmotti A, Mattia S, et al. *The degree of chondral fragmentation affects extracellular matrix production in cartilage autograft implantation: an in vitro study*. Arthrosc J Arthrosc Relat Surg 2015;31:2335-41. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2015.06.025>.
- 15 Bonasia DE, Marmotti A, Rosso F, et al. *Use of chondral fragments for one stage cartilage repair: a systematic review*. World J Orthop 2015;6:1006-11. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i11.1006>.
- 16 Bonasia DE, Martin JA, Marmotti A, et al. *The use of autologous adult, allogenic juvenile, and combined juvenile-adult cartilage fragments for the repair of chondral defects*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2016;24:3988-96. <https://doi.org/10.1007/s00167-015-3536-5>.
- 17 Marmotti A, Bonasia DE, Bruzzone M, et al. *Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF- β 1 and G-CSF*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2013;21:1819-33. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-2244-7>.
- 18 Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, et al. *One-step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2012;20:2590-601. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-1920-y>.
- 19 Marmotti AG, Peretti GM, Mattia S, et al. *One-step cartilage repair with minced chondral fragment on a composite scaffold: an in vitro human study at low oxygen tension*. J Biol Regul Homeost Agents 2017;31:113-20.
- 20 Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, et al. *Autologous cartilage fragments in a composite scaffold for one stage osteochondral repair in a goat model*. Eur Cell Mater 2013;26:15-31;discussion 31-32.
- 21 Tsuyuguchi Y, Nakasa T, Ishikawa M, et al. *The benefit of minced cartilage over isolated chondrocytes in atelocollagen gel on chondrocyte proliferation and migration*. Cartilage 2018;1947603518805205. <https://doi.org/10.1177/1947603518805205>.
- 22 Matsushita R, Nakasa T, Ishikawa M, et al. *Repair of an osteochondral defect with minced cartilage embedded in atelocollagen gel: a rabbit model*. Am J Sports Med 2019;47:2216-24. <https://doi.org/10.1177/0363546519854372>.
- 23 Marmotti A, Mattia S, Castoldi F, et al. *Allogeneic umbilical*

- cord-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cartilage and bone regeneration: an in vitro study.* Stem Cells Int 2017;1732094. <https://doi.org/10.1155/2017/1732094>.
- ²⁴ Marmotti A, Peretti GM, Mattia S, et al. *Pulsed electromagnetic fields improve tenogenic commitment of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: a potential strategy for tendon repair-an in vitro study.* Stem Cells Int 2018;9048237. <https://doi.org/10.1155/2018/9048237>.
- ²⁵ Zhang B-Y, Wang B-Y, Li S-C, et al. *Evaluation of the curative effect of umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for knee arthritis in dogs using imaging technology.* Stem Cells Int 2018;1983025. <https://doi.org/10.1155/2018/1983025>.
- ²⁶ Sadlik B, Jaroslowski G, Puzscharz M, et al. *Cartilage repair in the knee using umbilical cord wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells embedded onto collagen scaffolding and implanted under dry arthroscopy.* Arthrosc Tech 2018;7:e57-e63. <https://doi.org/10.1016/j.eats.2017.08.055>.
- ²⁷ Esposito M, Lucariello A, Costanzo C, et al. *Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs, into chondrogenic cells in the presence of pulsed electromagnetic fields.* Vivo Athens Greece 2013;27:495-500.
- ²⁸ Viganò M, Sansone V, d'Agostino MC, et al. *Mesenchymal stem cells as therapeutic target of biophysical stimulation for the treatment of musculoskeletal disorders.* J Orthop Surg 2016;11:163. <https://doi.org/10.1186/s13018-016-0496-5>.
- ²⁹ Lee CH, Cook JL, Mendelson A, et al. *Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study.* Lancet Lond Engl 2010;376:440-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60668-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60668-X).
- ³⁰ Marmotti A, Castoldi F, Rossi R, et al. *Bone marrow-derived cell mobilization by G-CSF to enhance osseointegration of bone substitute in high tibial osteotomy.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2013;21:237-248. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-2150-z>.
- ³¹ Zhao D, Li Y, Zhou X, et al. *Peripheral blood mesenchymal stem cells combined with modified demineralized bone matrix promote pig cartilage defect repair.* Cells Tissues Organs 2018;206:26-34. <https://doi.org/10.1159/000493210>.
- ³² Truong M-D, Choi BH, Kim YJ, et al. *Granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF) significantly enhances articular cartilage repair potential by microfracture.* Osteoarthritis Cartilage 2017;25:1345-52. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.03.002>.
- ³³ Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, et al. *Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis.* Sci Rep 2017;7:16214. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15376-8>.
- ³⁴ Liu X, Yang Y, Li Y, et al. *Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration.* Nanoscale 2017;9:4430-8. <https://doi.org/10.1039/c7nr00352h>.
- ³⁵ Soundsmyth Productions. *Where No One Has Gone Before - Alternate Star Trek Theme.* 2012.