

Эффективность комбинации аллогенной богатой тромбоцитами плазмы с коллагеном при лечении дефектов бедренной кости у крыс

А.Ю. Ваза, М.С. Макаров, В.В. Сластинин, Н.В. Боровкова, И.Ю. Клюквин,
Д.Ю. Похитонов, И.Н. Пономарев

ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва

Контакты: Александр Юльевич Ваза, vazal@inbox.ru

Проведен эксперимент по исследованию действия богатой тромбоцитами плазмы (БотП) в сочетании с коллагеном на процесс регенерации кости в дистальном отделе бедра крыс. Используемая доза крысиной БотП содержала 130–135 пг/мл тромбоцитарного фактора роста (PDGF). Установлено, что при таком уровне PDGF комбинация БотП и коллагена значительно ускоряла рост костных трабекул в области дефекта, стимулировала ангиогенез и снижала интенсивность воспалительной реакции. У всех обследованных животных использование аллогенной БотП позволило в 2 раза сократить сроки репарации дефекта бедренной кости.

Ключевые слова: богатая тромбоцитами плазма, тромбоциты с гранулами, PDGF, остеогенез.

Efficiency of allogenic platelet-rich plasma, combined with collagen, in rat's humerus injury healing

A.Yu. Vaza, M.S. Makarov, V.V. Slastinin, N.V. Borovkova, I.Yu. Klyukvin,
D.Yu. Pokhitonov, I.N. Ponomarev

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow

In experiment we studied influence of collagen, filled with platelet-rich plasma (PRP), on rats' bone regeneration in distal humerus. Used dose of PRP contained 130–135 pg/ml platelet-derived growth factor (PDGF). According to this level of PDGF, PRP-collagen treatment rapidly enhanced trabecular bones' growth, stimulated angiogenesis and reduced intensity of inflammation. Allogenic PRP, addressed to all experimental animals, allowed to make humerus healing 2 times shorter.

Keywords: platelet rich plasma, platelets with granules, PDGF, osteogenesis.

Введение

С развитием эндопротезирования тазобедренного сустава проблема лечения пациентов с переломами шейки бедренной кости стоит уже не так остро, как прежде. В то же время для лечения подобных переломов без смещения и вколоченных переломов предпочтение отдается остеосинтезу [1, 2]. Положительный клинический эффект остеосинтеза показан у пациентов разных возрастных групп [1–5], в том числе у лиц старше 60 лет [2, 3], что говорит об эффективности этой методики; вместе с тем, остеосинтез до сих пор не позволяет полностью избежать риска несращения или аваскулярного некроза головки бедренной кости [6–10]. По нашим данным, частота ослож-

нений при лечении переломов шейки бедренной кости у больных всех возрастных групп может достигать 29% [11]. Во многом развитие дистрофических процессов в кости связано с нарушением питания, низким уровнем ангиогенеза костной ткани в области повреждения, а также миграции и пролиферации остеобластов. Для стимуляции процессов репарации перелома и регенерации кости могут быть использованы различные биологически активные трансплантаты. Одним из наиболее известных и доступных материалов, используемых для этой цели, является коллаген человека 1-го типа, который способствует привлечению в область костного дефекта клеток соединительной ткани и их пролиферации, стимулирует прорастание сосудов, способству-

ет фиксации иммобилизирующих конструкций и протезов. В научной и клинической практике используют гели, губки, трехмерные матрицы на основе коллагена, в состав которых часто входят дополнительные компоненты – гиалуроновая кислота, гидроксипатит, деминерализованная кость [12–14]. При этом считается, что коллагеновые трансплантаты выполняют главным образом остеокондуктивную функцию, т.е. являются проводниками для роста будущей костной массы, миграции клеток, но при этом сами по себе не обладают остеоиндуктивными свойствами. Стимулировать непосредственно регенеративные процессы в области костного дефекта/перелома можно с использованием различных ростовых факторов – тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов (FGF), трансформирующего фактора роста (TGF- β 1), инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), факторов роста сосудов и эндотелия (VEGF, VGF) [17, 18]. Все указанные факторы содержатся в гранулах (секреторных везикулах) биологически полноценных тромбоцитов [15]. К настоящему времени показано, что тромбоциты человека обладают весьма высокими репаративным и регенераторным потенциалами, которые могут быть использованы для восстановления повреждений соединительной ткани, в том числе кости [16–19]. Таким образом, есть основание полагать, что био-трансплантаты на основе коллагена и тромбоцитов способны значительно ускорить регенерацию костного дефекта.

Целью настоящей работы было оценить влияние аллогенных тромбоцитов в комбинации с коллагеном на процессы репаративного остеогенеза при повреждении суставных концов кости.

Материал и методы

Экспериментальное исследование по оценке эффективности влияния коллагена на регенерацию костных дефектов было выполнено на базе лаборатории экспериментальной патологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (руководитель – д-р мед. наук, проф. Т.С. Попова). При проведении эксперимента руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях № 123 от 18.03.1986 и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1975 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Эксперимент проведен на 64 беспородных крысах, которых содержали на обычном рационе вивария. Забой животных осуществляли путем внутрибрюшинного введения летальной дозы гексенала.

Получение коллагена

Аллогенный коллаген 1-го типа получали из хвостов крыс, используя стандартную методику [20]. Сухожилия хвостов крыс измельчали в гомогенизаторе до кашеобразного состояния, получившуюся массу помещали в раствор 1 М NaCl на буфере Tris-HCl (рН – 7,2–7,5) в объемном соотношении 1:30–1:50. Через 3–4 суток осажденный коллаген собирали, тщательно промывали дистиллированной водой для удаления остатков соли и растворяли в 0,1–0,5 М уксусной кислоты. В результате образовывался коллагеновый гель. Затем гель коллагена несколько раз отмывали от остатков кислоты дистиллированной водой. Полученный коллагеновый гель имел слабую кислую реакцию (рН – 6,5–6,7).

Получение аллогенной богатой тромбоцитами плазмы

Богатую тромбоцитами плазму крыс (кБоТП) заготавливали по методу Messori et al. [21]. У каждого животного эксфузировали 5 мл крови, смешивали с антикоагулянтом (цитрат натрия) и центрифугировали при 160 g в течение 20 минут, отбирали надосадок, который повторно центрифугировали при 400–500 g в течение 15 минут, после чего отбирали нижнюю фракцию (готовая кБоТП, средний объем – 0,5 мл). Концентрация тромбоцитов в полученной кБоТП составляла $1100\text{--}1300 \times 10^3/\text{мкл}$.

Модель костного дефекта

Перед операцией у крыс под наркозом сбривали шерсть на задних лапах с обоих коленных суставов и бедер. Разрез длиной от 1,0–1,5 см выполняли по наружной поверхности бедра проксимальнее коленного сустава таким образом, чтобы визуализировать дистальный наружный мышечек бедра, без артротомии. Костный дефект формировали в мышечке бедра сверлом диаметром 2,0 мм, глубиной до кортикального слоя внутреннего мышечка бедра. Внутрь образованного дефекта с помощью шприца вводили исследуемый препарат, после чего рану ушивали послойно. Операцию проводили на обеих задних конеч-

ностах. В эксперименте использовали крысиный коллаген, полученный в лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

В послеоперационном периоде крыс содержали на обычном рационе вивария. Подопытных животных разделили на три группы по 20 особей в каждой. Крыс выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 28-е и 84-е сутки.

Характеристика экспериментальных групп

В 1-й группе (сравнения) после нанесения костного дефекта рану ушивали без заполнения ее пластическим материалом. Во 2-й группе костный дефект заполняли крысиным коллагеном (объем – 150–200 мкл). В 3-й группе для заполнения костного дефекта использовали смесь крысиного коллагена/аллогенной БоТП в соотношении 1:1 (объем используемой смеси – 150–200 мкл).

Морфофункциональный анализ

Динамику восстановления кости в области дефекта анализировали на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Биологическую полноценность тромбоцитов крыс исследовали с помощью оригинального метода, основанного на окрашивании клеток витальным (прижизненным) флюорохромным красителем на основе триафлавина и акридинового оранжевого, с дальнейшим их анализом во флюоресцентном микроскопе [22]. В процессе анализа определяли следующие параметры: общее содержание тромбоцитов, тыс./мкл; содержание биологически полноценных тромбоцитов (клетки с гранулами), %; количество гранул на 1 биологически полноценный тромбоцит; морфофункциональную активность тромбоцитов (МФАТ), отражающую структурную целостность клеток, баллы; адгезивную активность тромбоцитов (ААТ), отражающую функциональную активность клеток, баллы.

Результаты и обсуждение

Одним из условий эффективного использования тромбоцитарного материала в качестве компонента биотрансплантатов являются оценка качества исходных клеток, а также оценка их насыщенности факторами роста и регенерации. Это необходимо не только для элиминации БоТП с низким содержанием нормальных тромбоцитов,

но и для выбора адекватной дозы используемого тромбоцитарного материала. Поэтому на первом этапе исследования необходимо было провести морфофункциональное исследование тромбоцитов крыс.

В обследованных кБоТП общее содержание тромбоцитов с гранулами составило в среднем 570 ± 110 тыс./мкл, что сопоставимо с аналогичным показателем в БоТП человека. Отличительной чертой тромбоцитов крыс являются их малый диаметр ($2,7 \pm 0,2$ мкм) и отсутствие выраженной гетерогенности клеток по диаметру, характерной для популяции тромбоцитов человека (рис. 1а). Подавляющее большинство клеток кБоТП имеет сходные линейные размеры, при этом содержание тромбоцитов с гранулами варьирует от 25 до 60%, составляя в среднем $44,5 \pm 5,5\%$. Это достоверно ниже, чем в БоТП человека ($55,6 \pm 7,8\%$); значения МФАТ и ААТ крысиных тромбоцитов также снижены и составляют соответственно $40,8 \pm 4,5$ и $44,0 \pm 5,2$ балла. Вместе с тем, среднее содержание визуально различимых гранул в биологически полноценных тромбоцитах крыс составляет $8,0 \pm 1,0$ на клетку и близко к аналогичному показателю человеческих тромбоцитов. Благодаря выявленной ранее корреляционной связи между морфофункциональными параметрами тромбоцитов и содержанием в них тромбоцитарного фактора роста, PDGF [23], представляется возможным косвенно оценить уровень PDGF в кБоТП, который составил в среднем 105 пг на 100 млн биологически полноценных клеток. В смеси крысиного коллагена/аллогенной БоТП среднее количество тромбоцитов с гранулами составило 26 млн клеток, общий объем содержащегося в них PDGF – порядка 27 пг. При нанесении кБоТП на коллаген имела место активация биологически полноценных тромбоцитов, сопровождавшаяся интенсивной дегрануляцией и формированием многочисленных тромбоцитарных агрегатов (рис. 1б), при этом в первые 10 минут на поверхности многих активированных клеток можно было отчетливо наблюдать выходящие гранулы. Через 10–20 минут после контакта с коллагеном гранулы теряли контакт с тромбоцитами и не были выявлены внутри цитоплазмы, что указывает на полное высвобождение гранул и их компонентов.

Послеоперационный период у животных всех экспериментальных групп протекал без видимых осложнений. Животные сохраняли активность, аппетит. На 7-е сутки у 2 животных группы сравнения отмечены признаки поверхностного нагноения послеоперационной раны. При гисто-

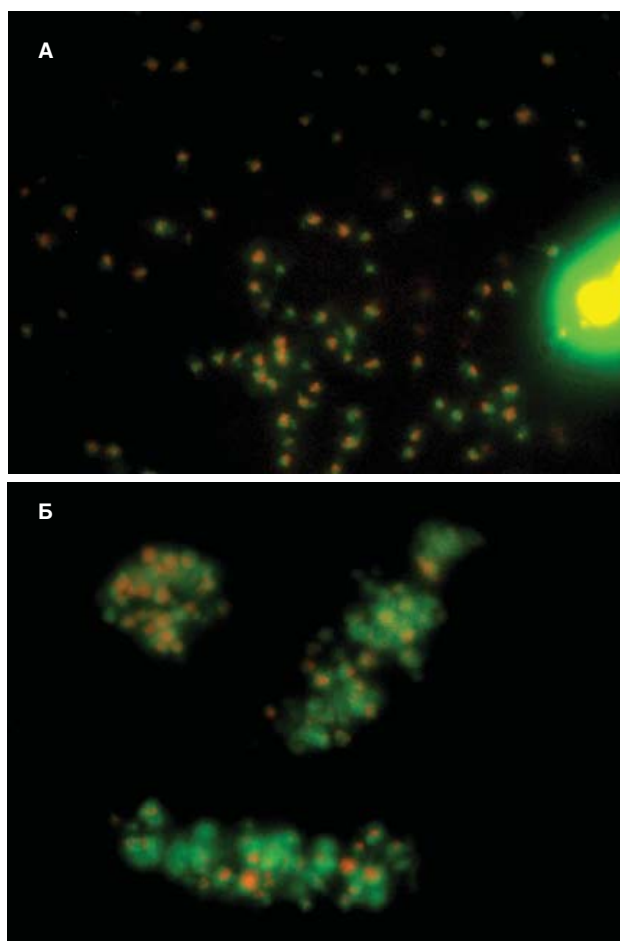


Рис. 1. Витально окрашенные тромбоциты крыс в исходной БоТП (а) и БоТП после контакта с коллагеном (б). Окраска трипафлавином акридиновым оранжевым. Увеличение $\times 1500$

логическом исследовании на 7-е сутки у животных группы сравнения костный дефект заполнен сгустком крови, содержащим большое количество эритроцитов и нитей фибрина. В группе крыс, леченных коллагеном, дефект заполнен также сгустком крови и коллагеновым гелем, при этом коллагеновые волокна в составе геля сохраняли свою структуру (рис. 2). В сгустке и по краям дефекта у животных 1-й и 2-й групп наблюдалась интенсивная инфильтрация клетками воспаления (главным образом макрофагами), отдельные очаги инфильтрации также выявлены в прилегающих тканях (рис. 3а). По краям дефекта отмечен слабый рост костных трабекул, на большей части протяженности новообразующиеся трабекулы имели выраженное оксифильное окрашивание, в некоторых местах – слабобазофильное, что говорит о незначительном накоплении в них неорга-

нического костного матрикса (рис. 3б). По краям дефекта можно видеть формирование отдельных тонкостенных сосудов. В группе лечения коллагеном и кБоТП степень инфильтрации костного дефекта клетками воспаления была менее выражена, чем у животных 1-й и 2-й групп, очаги инфильтрации в прилегающих тканях не выявлены у 3 крыс из 5. По краям дефекта отмечен интенсивный рост костных трабекул, которые имели слабобазофильное окрашивание; с другой стороны, содержание в них остеобластов было в 2–3 раза выше, чем в группе сравнения. Также наблюдался интенсивный рост сосудов с проникновением их по всей глубине дефекта (рис. 4а). В центральной части дефекта у большинства животных отмечены активное врастание слабо пигментированных трабекул и сосудов, миграция фибробластов и остеобластов (рис. 4б).

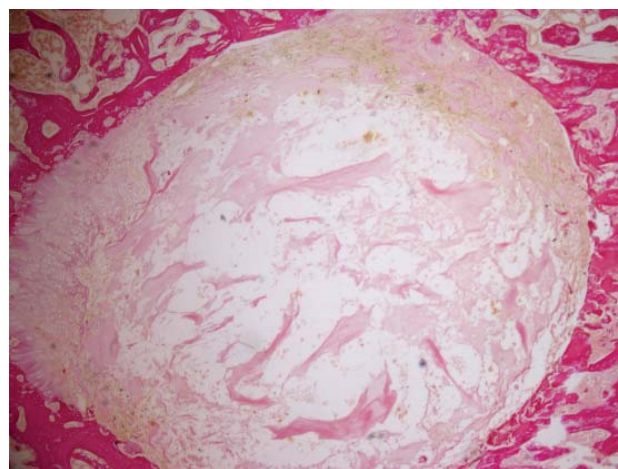


Рис. 2. Гистологическая картина костного дефекта у крыс, леченных коллагеном, на 7-е сутки после начала эксперимента. Окраска по Ван-Гизону, увеличение $\times 200$

Через 14 суток в группе сравнения инфильтрация области костного дефекта клетками воспаления снизилась, наблюдались рост и утолщение костных балок (рис. 5а), хотя число остеобластов в их составе и степень базофилии были заметно меньше, чем в группе лечения коллагеном и кБоТП на 7-е сутки. В группе лечения коллагеном значительная область дефекта (75%) была заполнена слабо пигментированными костными трабекулами, клетки воспаления отсутствовали, наблюдалась интенсивная миграция фибробластов и остеобластов (рис. 5б). В группе лечения коллагеном и кБоТП у всех обследованных животных область дефекта была практически неразличима на гистологических препаратах:

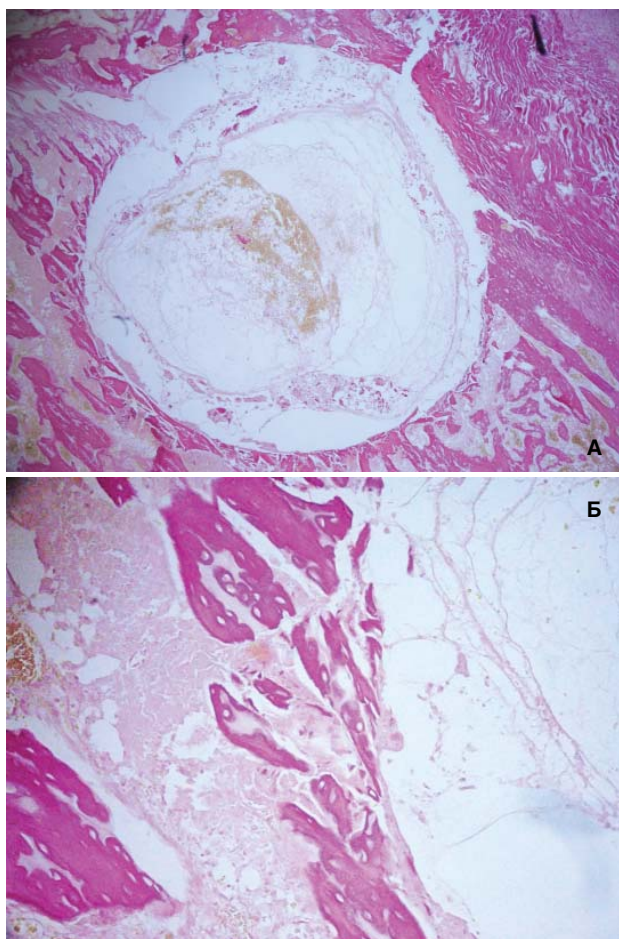


Рис. 3. Гистологическая картина костного дефекта у крыс группы сравнения (без лечения) на 7-е сутки после начала эксперимента. Окраска по Ван-Гизону (а – увеличение $\times 40$; б – увеличение $\times 250$)

на месте дефекта сформировалась полноценная трабекулярная костная ткань с нормальным развитием костных трабекул (рис. 5в), в которых большая часть клеток представлена веретеновидными остеоцитами.

Через 28 суток площадь дефекта с полностью восстановившейся трабекулярной костью в группе сравнения составила 80%, в группах лечения коллагеном и коллагеном+кБоТП – 100%. При этом во всех случаях дефекты костной ткани гистологически не были выявлены (рис. 6). Через 84 суток (12 недель) в месте нанесения экспериментального дефекта у животных всех групп отмечено полное восстановление структурной целостности костной ткани.

При современном методе лечения переломов шейки бедренной кости фиксацию отломков кости проводят через небольшие разрезы кожи

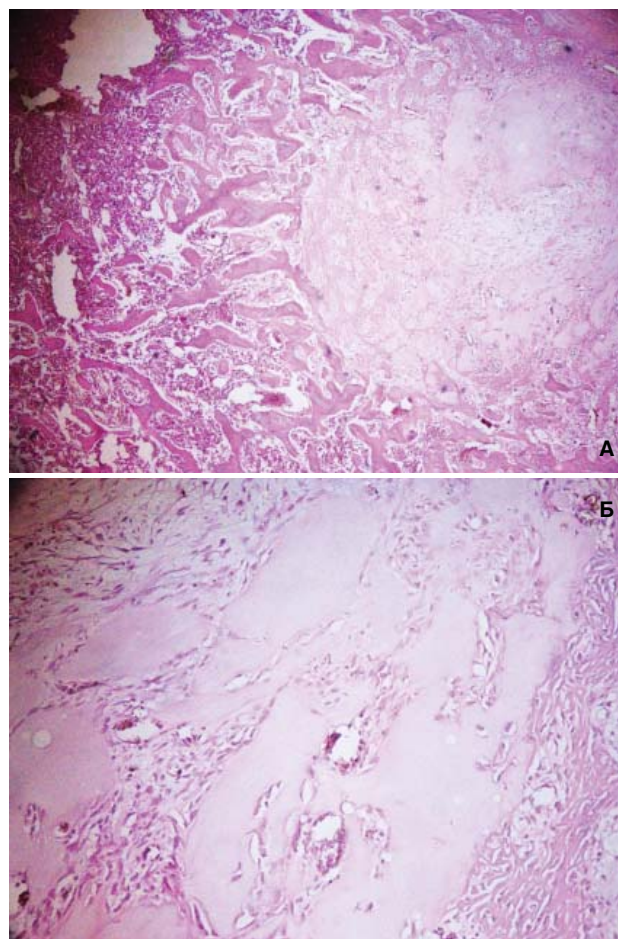


Рис. 4. Гистологическая картина костного дефекта у крыс группы лечения коллагеном и кБоТП на 7-е сутки после начала эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином (а – увеличение $\times 100$; б – увеличение $\times 250$)

без обнажения места перелома, поэтому вещества, стимулирующие остеогенез, лучше всего вводить путем инъекции. В этом смысле коллаген и БоТП являются очень удобными компонентами, которые могут быть использованы как в растворенной, так и в гелевой формах. Уже весьма широко описано применение тромбоцитарного геля при лечении механических повреждений кости, в частности при переломах челюстных костей, диабетических переломах, диабетической остеоартропатии [16, 24–26]; считается, что предпочтительнее использовать готовые гели, чем простую БоТП. Тем не менее, известно большое число случаев, когда применение препаратов, содержащих компоненты тромбоцитов, при лечении механических дефектов кости не давало желаемого клинического результата; более того, компоненты БоТП способны ингибировать про-

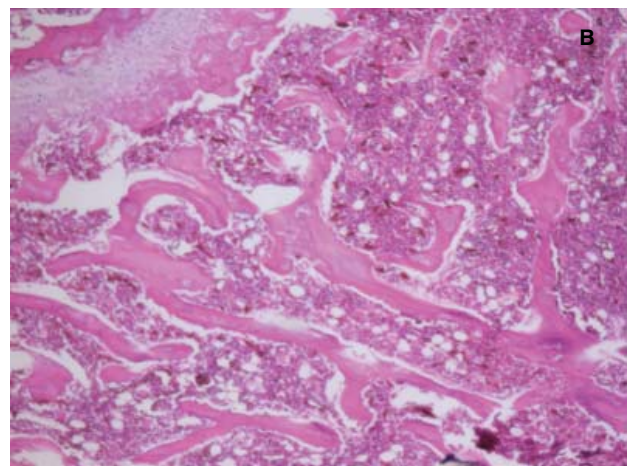
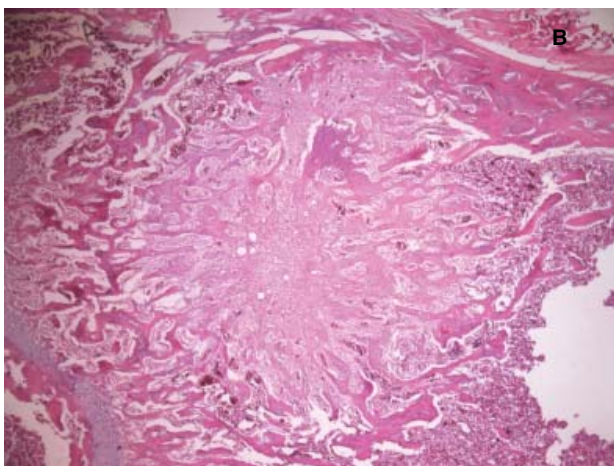
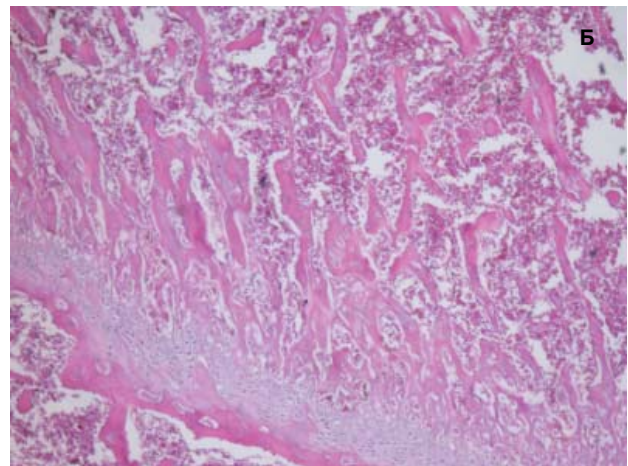
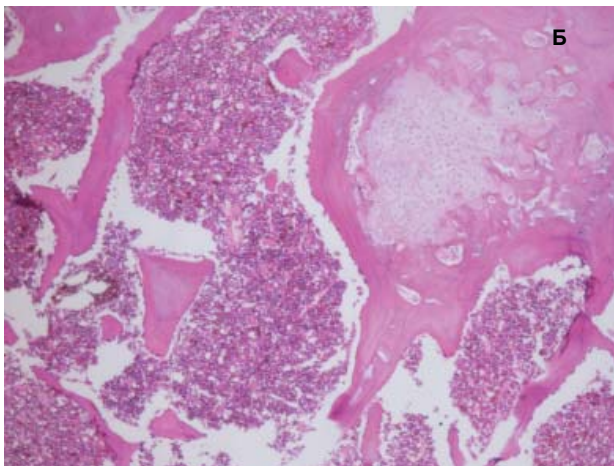
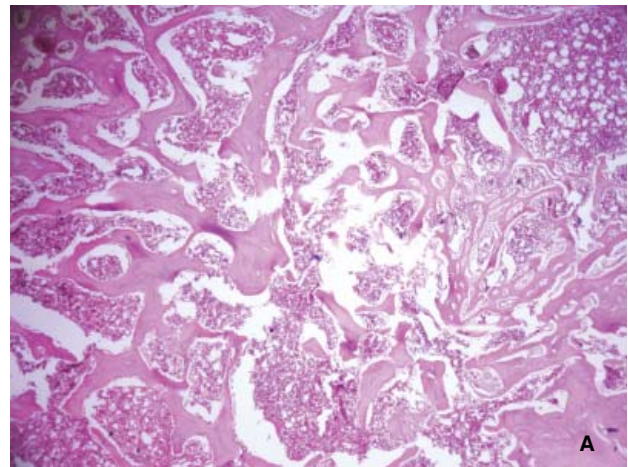
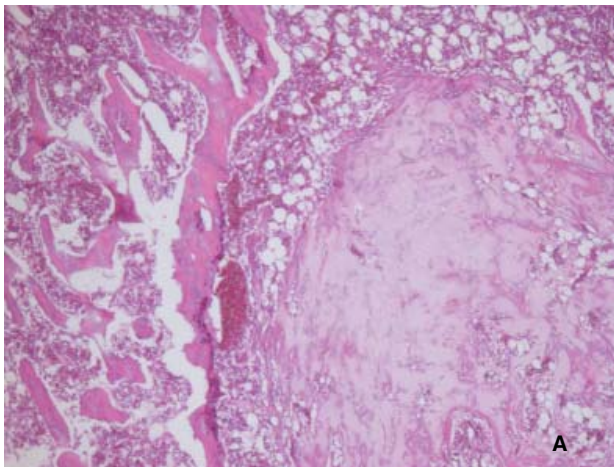


Рис. 5. Гистологическая картина костного дефекта на 14-е сутки после начала лечения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100 (а – группа сравнения (без лечения); б – группа лечения коллагеном; в – группа лечения коллагеном и кБоТП)

Рис. 6. Гистологическая картина костного дефекта на 28-е сутки после начала лечения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 100 (а – группа сравнения (без лечения); б – группа лечения коллагеном; в – группа лечения коллагеном и кБоТП)

лиферацию остеобластов, а также препятствовать созреванию зрелой костной ткани. Дело в том, что тромбоциты содержат большой спектр химических факторов, многие из которых оказывают патофизиологическое действие в условиях их избытка или отсутствия баланса с другими факторами [15]. Поэтому успех применения БоТП во многом зависит от адекватно выбранной дозы, которая может оцениваться как по числу биологически активных тромбоцитов, так и по уровню ростовых факторов. Используемый нами метод морфофункционального анализа тромбоцитов позволяет оценить уровень PDGF в зависимости от количества клеток с гранулами [22, 23]. PDGF является мощным репаративным агентом, кроме того, его концентрация в тромбоцитах коррелирует с концентрацией ряда других факторов [15], т.е. определяя морфофункциональный статус тромбоцитов, мы имеем возможность приблизительно оценить их насыщенность ростовыми факторами в целом. Применяемая в нашей работе готовая доза коллаген+БоТП содержала в среднем 130–135 пг PDGF в расчете на 1 мл и была весьма эффективной при лечении дефекта губчатой кости у крыс. Использование кБоТП в комбинации с коллагеном позволило в 2 раза сократить время репарации костного дефекта, при этом действие БоТП давало выраженный противовоспалительный эффект, что особенно важно в клинической практике. Известно, что дегрануляция тромбоцитов приводит к высвобождению, в том числе противовоспалительных и провоспалительных факторов (IL-1, IL-6, TNF- β), избыток которых вызывает ингибирование остеогенеза [27, 28]. При этом и ростовые, и рост-ин-

гибирующие факторы содержатся в одних и тех же гранулах тромбоцитов, что еще более подчеркивает важность оценки насыщенности тромбоцитов гранулами. Ранее нами было показано, что сыворотка, приготовленная из БоТП, содержащая 100–150 пг/мл PDGF, резко усиливает пролиферативную активность диплоидных клеток *in vitro*, не вызывая их повреждения или трансформации [23]. Таким образом, подобранное сочетание коллагена и БоТП является, безусловно, удачной находкой и требует дальнейшего исследования как на экспериментальных животных, так и в клинической практике.

Выводы

1. Применение БоТП снижает интенсивность воспалительной реакции в зоне дефекта кости у крыс. В гистологических препаратах у 3 животных из 5 отсутствовала инфильтрация клетками воспаления при интенсивном росте сосудов в месте повреждения и миграции фибробластов и остеобластов.
2. Использование кБоТП в комбинации с коллагеном высвобождает ростовые факторы из тромбоцитарных гранул, что позволяет в 2 раза сократить срок репарации костного дефекта у крыс.
3. В ходе эксперимента получены благоприятные результаты, которые дают основание для применения комбинации аутогенной БоТП и аллогенного коллагена в клинической практике.
4. Для получения наилучшего эффекта в клинической практике требуется подбор оптимальной дозы БоТП и коллагена.

Литература

1. Surgical management of hip fractures: an evidence-based review of the literature. I: femoral neck fractures / R.G. Miyamoto, K.M. Kaplan, B.R. Levine [et al.] // *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* – 2008. – Vol. 16, N. 10. – P. 596–607.
2. Cancellous screw fixation for undisplaced femoral neck fractures in the elderly / R. Manohara, S. Liang, D. Huang, L. Krishna // *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)*. – 2014. – Vol. 22, N. 3 – P. 282–286.
3. Lin, J.C. Outcomes after fixation for undisplaced femoral neck fracture compared to hemiarthroplasty for displaced femoral neck fracture among the elderly / J.C. Lin, W.M. Liang // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2015. – Vol. 16. – P. 199.
4. Management of femoral neck fractures in the young patient: A critical analysis review / T. Pauyo, J. Drager, A. Albers, E.J. Harvey // *World J. Orthop.* – 2014. – Vol. 5, N. 3. – P. 204–217.
5. Gerber, C. The treatment of fractures of the femoral neck / C. Gerber, J. Strehle, R. Ganz // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1993. – Vol. 292. – P. 77–86.
6. Complications following young femoral neck fractures / G.P. Slobogean, S.A. Sprague, T. Scott, M. Bhandari // *Injury*. – 2015. – Vol. 46, N. 3. – P. 484–491.
7. Complications of hip fractures: A review / P. Carpintero, J.R. Caeiro, R. Carpintero [et al.] // *World J. Orthop.* – 2014. – Vol. 5, N. 4. – P. 402–411.
8. Hip fractures in adults younger than 50 years of age. Epidemiology and results / C.M. Robinson, C.M. Court-Brown, M.M. McQueen, J.Christie // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1995. – Vol. 312. – P. 238–246.
9. Talboys, R. The management of intracapsular hip fractures in the ‘young elderly’ internal fixation or total hip replacement? / R. Talboys, L. Pickup, A. Chojnowski // *Acta Orthop. Belg.* – 2012. – Vol. 78, N. 1. – P. 41–48.
10. Houdek, M.T. Osteonecrosis of the femoral head: treatment with ancillary growth factors / M.T. Houdek, C.C. Wyles, R.J. Sierra // *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* – 2015. – Vol. 8, N.3. – P. 233–239.
11. Стимуляция регенерации гиалинового хряща при костно-хрящевой травме в эксперименте / М.Ш. Хубутя, И.Ю. Клюквин, Л.П. Истранов [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – № 11. – P. 597 – 599.
12. Laurencin, C. Bone graft substitutes / C. Laurencin, Y. Khan, S.F. El-Amin // *Exp. Rev. Med. Dev.* – 2006. – Vol. 3, N. 1.–P. 49–57.
13. 3D Printing of Composite Calcium Phosphate and Collagen Scaffolds for Bone Regeneration / J.A. Inzana, D. Olvera, S.M. Fuller [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, N. 13. – P. 4026–4034.
14. Novel Microhydroxyapatite Particles in a Collagen Scaffold: A Bioactive Bone Void Filler? / F.G. Lyons, J.P. Gleeson, S. Partap, [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2014. – Vol. 472, N. 4. – P. 1318–1328.
15. Lacci, K.M. Platelet-rich Plasma: support for its use in wound healing / K.M. Lacci, A. Dardik // *Yale J. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 83, N. 1. –P. 1–9.
16. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect / D. Smrke, B. Gubina, D. Domanović, P. Rozman // *Eur. Surg. Res.* – 2007. – Vol. 39, N. 3. – P. 170–174.
17. Ozdemir, B. Treatment of intrabony defects with betatricalciumphosphate alone and in combination with platelet-rich plasma / B. Ozdemir, E.J. Okte // *Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* – 2012. – Vol. 100, N. 4. –P. 976–983.
18. Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects / Z. Yassibag-Berkman, O. Tuncer, T. Subasioglu, A. Kantarci // *J. Periodontol.* – 2007. – Vol. 78, N. 5. – P. 801–809.
19. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity / B. Han, J. Woodell-May, M. Ponticciello [et al.] // *J. Bone Joint Surg. A.* – 2009. – Vol. 91, N. 6. –P. 1459–1470.
20. Abedin, M.Z. Collagen heterogeneity and its functional significance / M.Z. Abedin, R. Riemschneider // *Die Ang. Makromol. Chem.* –1983. – Vol. 111, Is. 1. – P. 107–122.
21. A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats / M.R. Messori, M.J.H. Nagata, F.A.C. Furlaneto [et al.] // *RSBO*. – 2011. – Vol. 8, N. 3. – P. 299–304
22. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2013. – Т. 156, № 9. – С. 388–391.
23. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, О.И. Конюшко [и др.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2013. – № 2. – С. 111–115.
24. Anitua, A. The therapeutic potential of PRGF in dentistry and oral implantology. Ch.3 / A. Anitua, G. Orive, I. Andia // *Implant and Regenerative Therapy in Dentistry: A Guide To Decision Making* / P. Fugazzotto. – Wiley-Blackwell, 2009. – P. 113–121.
25. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel / M. Scala, M. Gipponi, P.Mereu [et al.] // *In Vivo*. –2010. – Vol. 24, N. 6. – P. 889–893.
26. The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial / M. Badr, P. Coulthard, R. Alissa, R. Oliver // *Eur. J. Oral. Implantol.* – 2010. – Vol. 3, N. 3. – P. 233–244.
27. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution / R.C. Pereira, M. Scaranari, R. Benelli [et al.] // *Tissue Eng. Part. A.* – 2013. – Vol. 19, N. 11–12. – P. 1476–1488.
28. Irie, K. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee / K. Irie, E. Uchiyama, H. Iwaso // *Knee*. –2003. – Vol.10, N. 1. – P. 93–96.

References

1. Miyamoto R.G., Kaplan K.M., Levine B.R., et al. Surgical management of hip fractures: an evidence-based review of the literature. I: femoral neck fractures. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008; 16 (10): 596–607.
2. Manohara R., Liang S., Huang D., Krishna L. Cancellous screw fixation for undisplaced femoral neck fractures in the elderly. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2014; 22 (3): 282–286.
3. Lin J.C., Liang W.M. Outcomes after fixation for undisplaced femoral neck fracture compared to hemiarthroplasty for displaced femoral neck fracture among the elderly. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015; 16: 199.
4. Pauyo T., Drager J., Albers A., Harvey E.J. Management of femoral neck fractures in the young patient: A critical analysis review. *World J Orthop.* 2014; 5 (3): 204–217.
5. Gerber C., Strehle J., Ganz R. The treatment of fractures of the femoral neck. *Clin Orthop Relat Res.* 1993; 292: 77–86.
6. Slobogean G.P., Sprague S.A., Scott T., Bhandari M. Complications following young femoral neck fractures. *Injury.* 2015; 46 (3): 484–491.
7. Carpintero P., Caeiro J.R., Carpintero R., et al. Complications of hip fractures: A review. *World J Orthop.* 2014; 5 (4): 402–411.
8. Robinson C.M., Court-Brown C.M., McQueen M.M., Christie J. Hip fractures in adults younger than 50 years of age. Epidemiology and results. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 312: 238–246.
9. Talboys R., Pickup L., Chojnowski A. The management of intracapsular hip fractures in the 'young elderly' internal fixation or total hip replacement? *Acta Orthop Belg.* 2012; 78 (1): 41–48.
10. Houdek M.T., Wyles C.C., Sierra R.J. Osteonecrosis of the femoral head: treatment with ancillary growth factors. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015; 8 (3): 233–239.
11. Khubutiya M.Sh., Klyukvin I.Yu., Istranov L.P., et al. Stimulyatsiya regeneratsii gialinovogo khryashcha pri kostno-khryashchevoy travme v eksperimente [Stimulation of regeneration of hyaline cartilage with osteochondral injury in experiment]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2008; 11: 597–599. (In Russian).
12. Laurencin C., Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes. *Exp Rev Med Dev.* 2006; 3 (1): 49–57.
13. Inzana J.A., Olvera D., Fuller S.M., et al. 3D Printing of Composite Calcium Phosphate and Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *Biomaterials.* 2014; 35 (13): 4026–4034.
14. Lyons F.G., Gleeson J.P., Partap S., et al. Novel Microhydroxyapatite Particles in a Collagen Scaffold: A Bioactive Bone Void Filler? *Clin Orthop Relat Res.* 2014; 472 (4): 1318–1328.
15. Lacci K.M., Dardik A. Platelet-rich Plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* 2010; 83 (1): 1–9.
16. Smrke D., Gubina B., Domanović D., Rozman P. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. *Eur Surg Res.* 2007; 39 (3): 170–174.
17. Ozdemir B., Okte E.J. Treatment of intrabony defects with betatricalciumphosphate alone and in combination with platelet-rich plasma. *Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100 (4): 976–983.
18. Yassibag-Berkman Z., Tuncer O., Subasioglu T., Kantarci A. Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. *J Periodontol.* 2007; 78 (5): 801–809.
19. Han V., Woodell-May J., Ponticciello M., et al. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg A.* 2009; 91 (6): 1459–1470.
20. Abedin M.Z., Riemschneider R. Collagen heterogeneity and its functional significance. *Die Ang Makromol Chem.* 1983; 111 (1): 107–122.
21. Messori M.R., Nagata M.J.H., Furlaneto F.A.C., et al. A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO.* 2011; 8 (3): 299–304.
22. Makarov M.S., Kobzeva E.N., Vysochin I.V., et al. Morfofunktsional'nyy analiz trombotsitov cheloveka s pomoshch'yu vital'nogo okrashivaniya [Morphofunctional human platelet analysis by vital staining]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2013; 156 (9): 388–391. (In Russian).
23. Makarov M.S., Storozheva M.V., Konyushko O.I., et al. Vliyaniye kontsentratsii trombotsitarnogo faktora rosta na proliferativnuyu aktivnost' fibroblastov cheloveka [Effect of platelet derived growth factor concentration on the proliferative activity of human fibroblast]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine.* 2013; 2: 111–115. (In Russian).
24. Anitua A., Orive G., Andia I. The therapeutic potential of PRGF in dentistry and oral implantology. Ch. 3. In: Fugazzotto P., ed. *Implant and Regenerative Therapy in Dentistry: A Guide To Decision Making.* Wiley-Blackwell, 2009. 113–121.
25. Scala M., Gipponi M., Mereu P., et al. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel. *In Vivo.* 2010; 24 (6): 889–893.
26. Badr M., Coulthard P., Alissa R., Oliver R. The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol.* 2010; 3 (3): 233–244.
27. Pereira R.C., Scaranari M., Benelli R., et al. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19 (11–12): 1476–1488.
28. Irie K., Uchiyama E., Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee.* 2003; 10 (1): 93–96.