

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 6/6.72-018.3

**Изменения костной и хрящевой ткани при развитии
посттравматического остеоартрита
у генетически модифицированных мышей****А.Л.Торгомян¹, А.К. Гамбарян¹, Н.С.Артения²,
А.В.Азнаурян², Д.Н.Худавердян¹***ЕГМУ им. М.Гераци, ¹кафедра физиологии, ²кафедра гистологии
0025, Ереван, ул. Корюна, 2**Ключевые слова:* остеоартрит, сустав, гиалиновый хрящ, мышцы

Остеоартрит (ОА) является дегенеративным заболеванием суставов в результате чего суставной хрящ теряет нормальную структуру, что приводит к ограничению подвижности пораженного сустава, а с течением времени и к анкилозу. Остеоартрит поражает около 70-90% населения в возрасте от 60 лет и старше и является основной причиной инвалидности в данной возрастной группе. Наиболее распространенными причинами ОА коленного сустава являются механическая нагрузка, ожирение и травма [7, 34]. Кроме того, некоторые литературные источники указывают на наличие генетической предрасположенности у 50-75% пациентов, страдающих ОА, однако, количество исследований, посвященных изучению генов, предотвращающих развитие ОА, недостаточно [24, 36]. Исследования человеческого генома выявили, что наследование ОА является полигенным с множественными аллелями, поражение которых приводит к развитию ОА [28].

Клинически единственным радикальным лечением пациентов с дефектами хряща и ОА является остеотомия или полная замена пораженного сустава, в случае же наличия противопоказаний к проведению оперативного вмешательства единственным методом является чисто симптоматическое лечение обезболивающими и противовоспалительными препаратами. В последние годы с ограниченным успехом были проведены многочисленные исследования, посвященные попытке найти альтернативные методы восстановления поврежденного хряща [9, 19]. Таким образом, выявление генетического субстрата, вызывающего развитие или предохраняющего от ОА, будет в значительной степени способствовать нашему пониманию ОА и обеспечит не только новые стратегические направления в лечении, но также может способствовать выявлению лиц,

подвергнутых риску развития ОА, и своевременному предотвращению данной патологии.

Так, совершенно недавно разработанные экспериментальные модели ОА на мышах показали, что некоторые штаммы мышей в значительной степени защищены от развития ОА [17, 39]. В частности, MRL/MpJ и DBA/1 мыши генетически защищены от посттравматического артрита и в значительно меньшей степени поражаются ОА по сравнению с C57BL/69 мышами. Данные штаммы мышей также обладают выраженной способностью восстановления дефектов хряща, охватывающих полную толщину суставного хряща [18, 20].

Хотя указанные штаммы мышей являются беспородными и, следовательно, имеют различные генетические вариации, однако, данные результаты подтверждают гипотезу о том, что конкретные участки генома могут способствовать началу и прогрессированию ОА и быть ответственными за регенерацию тканей.

С целью изучения генетической основы развития ОА более подробно, были выведены рекомбинантные чистокровные линии мышей LG/J (заживление дефекта ушного хряща) и SM/J (отсутствие заживления дефекта ушного хряща) [3]. Штамм LG/J является родоначальником линии MRL/MpJ и 75% от его генома идентичны с геномом потомков [30]. Данные рекомбинантные чистокровные линии мышей были использованы с целью изучения наследования двух основных способностей: регенерации суставного хряща и заживления ушной раны [33]. Была обнаружена связь в наследовании этих двух особенностей фенотипа. Каждый рекомбинантный чистокровный штамм является рекомбинацией родительских генотипов, поэтому следует ожидать различную вариацию результатов в зависимости от сочетания родительского генетического материала.

С целью оценки развития и прогрессирования ОА в рекомбинантных чистокровных линиях была осуществлена дестабилизация медиального мениска (ДММ) посредством перерезки медиальной мениско-тибиальной (венечной) связки. Данная модель ОА была использована прежде [21] и обладает рядом преимуществ по сравнению с другими моделями, в частности такими, как легкая воспроизводимость и относительно медленное прогрессирование заболевания, что позволяет исследовать изменения во всем суставе в течение продолжительного времени.

В процессе развития ОА повреждается не только суставной хрящ, но и другие ткани сустава, в частности синовиальная оболочка, связки и кости. Так, радиологическими признаками ОА являются костные изменения, в частности формирование остеофитов и склероз субхондральной кости [37]. Кроме того, было показано, что минеральная плотность кости у пациентов с рентгенографическими симптомами ОА значительно выше, чем у здоровых людей [31]. Однако остается невыясненным являются ли костные изменения, наблюдаемые при прогрессировании ОА, результатом

поражения хряща или же они предшествуют дегенерации хрящевой ткани сустава [8]. При отсутствии возможности изучения ранних стадий развития ОА у людей в настоящем исследовании предоставляется возможность контроля костных изменений, происходящих с течением времени при индукции и прогрессировании ОА у мышей.

Таким образом, целью настоящего исследования является индукция ОА у рекомбинантных штаммов мышей, являющихся потомками чистокровных LG/J и SM/J линий, при этом были выбраны штаммы 6 и 33, так как они обладают наиболее выраженной способностью исцеления дефекта ушного хряща (штамм 6) или же полным отсутствием регенерации ушного дефекта (штамм 33) [2, 33]. Кроме того, мы попытаемся выявить зависимость степени деформации хрящевой и костной ткани от генетического материала посредством микро-КТ.

Все исследования проводились согласно требованиям Этического комитета Вашингтонского университета.

Материал и методы

Образование дефекта ушной раковины

Способность хрящевых тканей к регенерации дефекта у мышей штаммов 6 и 33 оценивалась их реакцией на повреждение ушной раковины. Хирургическим путем у 6-недельных мышей были в каждом ухе проколоты отверстия в 2 мм, согласно ранее описанному протоколу [15]. Диаметр образованных отверстий был зарегистрирован на 30-й день после прокола.

Хирургическая индукция ОА

Мыши (самцы) в возрасте 10 недель были анестезированы внутрибрюшинной инъекцией кетамина (100 мг/кг), ксилазина (20 мг/кг) и ацепромазина (10 мг/кг). Дестабилизация медиального мениска была произведена в правом коленном суставе посредством перерезки медиальной мениско-тибиальной связки [21]. Суставная капсула была вскрыта небольшим разрезом медиальной связки надколенника, и связка перерезана микрохирургическими ножницами. Контролем являлся левый коленный сустав. Мыши подвергались эфтаназии через 2, 4 и 8 недель после операции, коленные суставы были исследованы посредством микрокомпьютерной томографии (микро-КТ) и гистологического анализа.

Гистологическое исследование суставного хряща

В указанные сроки эксперимента коленные суставы животных были зафиксированы в 10% нейтральном буферном растворе формалина, декальцифицированы 10% муравьиной кислотой и залиты в парафин. Сагиттальные срезы после депарафинизации были окрашены толуидиновым синим, изучены с использованием микроскопа (Eclipse E800; Nikon) и засняты встроенной камерой (2000R Fast1394; Retiga).

Сканирование микро-КТ и количественное определение морфометрических параметров костной ткани

Зафиксированные коленные суставы до гистологического исследования были отсканированы с помощью микро-КТ сканера (vivaCT40, SCANCO) для анализа 3-мерной структуры и морфометрических параметров кости.

Результаты и обсуждение

Заживление дефекта ушной раковины

У мышей штамма 6 наблюдалась значительно выраженная способность к регенерации ушной раны (рис. 1а) по сравнению с мышами штамма 33 (рис. 1б).

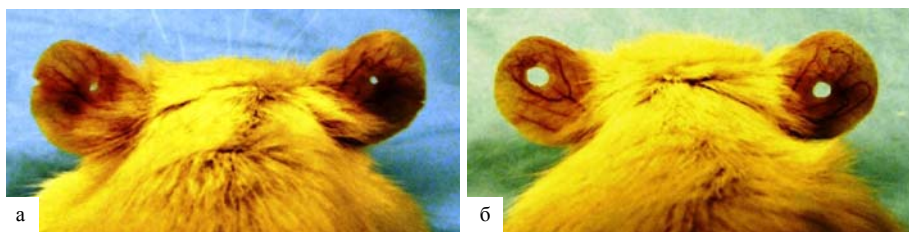


Рис. 1. а – заживление дефекта ушной раковины, штамм 6; б – заживление дефекта ушной раковины, штамм 33

Хирургическая индукция ОА

Оценка гистологических срезов коленных суставов позволила выявить более выраженную дегенерацию суставного хряща после хирургической индукции ОА у мышей штамма 33, чем у штамма 6 через 8 недель после хирургической процедуры. Так, у мышей штамма 33 в гиалиновом хряще отмечается выраженный фиброз со снижением количества протеогликанов, что проявляется снижением интенсивности окрашивания на 2-й неделе (рис. 2а), и глубокое поражение гиалинового хряща с его кальцификацией на 4-й и 8-й неделе после операции (рис. 2б, в).

В противоположность этому у мышей штамма 6 было выявлено локальное снижение количества протеогликанов с подавлением окрашивания без серьезных поражений суставного хряща в течение всего периода (рис. 3а,б,в). Таким образом, суммарная оценка хрящевых повреждений выявляет у штамма 6 снижение интенсивности окрашивания, шероховатую поверхность хряща, небольшой фиброз, охватывающий не более 25% суставной поверхности, в то время как у штамма 33 выявляются эрозии суставной поверхности, фиброз, распространяющийся по поверхности кальцифицированного суставного хряща (75%).

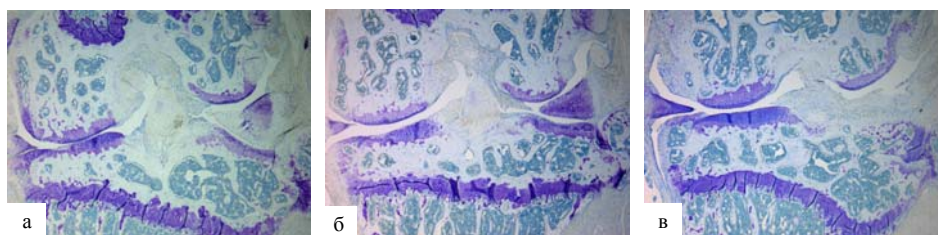


Рис. 2. а–штамм 6 (2-я неделя); б–штамм 6 (4-я неделя); в–штамм 6 (8-я неделя)

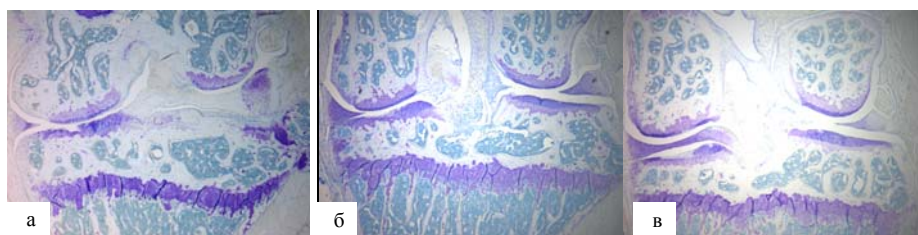


Рис. 3. а–штамм 33 (2-я неделя); б–штамм 33 (4-я неделя); в–штамм 33 (8-я неделя)

Оценка морфометрических параметров костной ткани посредством микро-КТ

Эпифизы костей голени (медиальной и латеральной большеберцовой) были изучены с целью определения морфометрических параметров на 2-, 4- и 8-й неделе после операции (рис. 4). Различия в толщине субхондральной костной пластинки наблюдались в течение всего периода. Так, у штамма 33 было выявлено истончение субхондральной кости пластинки в ранние периоды после операции (2-я и 4-я недели), однако от 4-й до 8-й недели наблюдалось значительное утолщение субхондральной костной пластины в медиальной и латеральной большеберцовых костях. С другой стороны, мыши штамма 6 показали истончение во все периоды эксперимента в обеих костях голени.



Рис. 4. Микро-КТ

Показатели соотношения общего костного объема к объему трабекулярной кости (BV/TV) у мышей штамма 6 значительно ниже в прооперированном колене, чем в контрольном во все периоды эксперимента, в то время как у мышей штамма 33 объем костной фракции значительно

сократился на 4-й неделе по сравнению с контролем, а затем увеличился к 8-й неделе в оперированном колене.

Толщина трубчатой кости в оперированных конечностях меньше, чем в контрольных у мышей штамма 6 во все периоды, в то время как у мышей штамма 33 толщина трабекулярной кости существенно не менялась по сравнению с контрольными конечностями, в частности на 8-й неделе.

Индекс плотности трабекулярной кости, который рассчитывает количество трабекулярных перекладин в кости, показал, что у мышей штамма 33 отмечается потеря губчатой кости на 4-й неделе и небольшое восстановление к 8-й неделе после операции, в то время как у мышей штамма 6 потеря губчатой кости наблюдалась как на 4-й, так и на 8-й неделе.

Проведенные исследования убедительно продемонстрировали, что рекомбинантные штаммы 6 и 33, полученные в результате скрещивания чистокровных LG/J и SM/J линий мышей значительно различаются по своей способности регенерировать поврежденную хрящевую ткань ушной раковины, а также гиалиновый хрящ коленного сустава [2, 33].

Наиболее важным представляется тот факт, что данные штаммы мышей отличаются также своей восприимчивостью к развитию ОА, который развивается после перерезки медиальной мениско-тибиальной связки (модель ОА).

Кроме того, предрасположенность к развитию ОА, по -видимому, коррелирует со способностью восстанавливать ткани ушной раковины. При этом у животных с выраженной способностью восстанавливать ушной хрящ отмечается меньшая предрасположенность к ОА и наоборот. Данные результаты подтверждаются схожими исследованиями [17, 18, 39], авторы которых выдвинули гипотезу о том, что способность исцелять ткани уха и способность к регенерации суставного хряща сосуществуют с сопротивлением хряща к дегенерации и предотвращают развитие ОА у мышей.

Так, общеизвестно, что ОА развивается в случае стимулирования хрящевых клеток, повышения уровня метаболической активности с преобладанием катаболических процессов над анаболическими [1, 22], что позволяет предложить простейшую интерпретацию наших результатов: более выраженный анаболический потенциал приводит к более развитой способности к регенерации хрящевой ткани и впоследствии к менее выраженной подверженности к развитию ОА.

Хотя исследуемые штаммы мышей (6 и 33) и отличаются фенотипическими свойствами регенерации, нами было изучено естественное развитие и прогрессирование ОА в этих штаммах, с целью выявления хрящевых и костных изменений в течение определенного времени.

Так, оценка представленных хрящевых изменений при индуцированном ОА позволяет заключить, что штамм 33 имеет значительно более высокую степень развития ОА в оперированном коленном суставе по сравнению с контролем. Кроме того, данный штамм имеет значительно более высокую степень развития ОА в результате ДММ на 4-й и 8-й неделе после оперативного вмешательства по сравнению со штаммом 6.

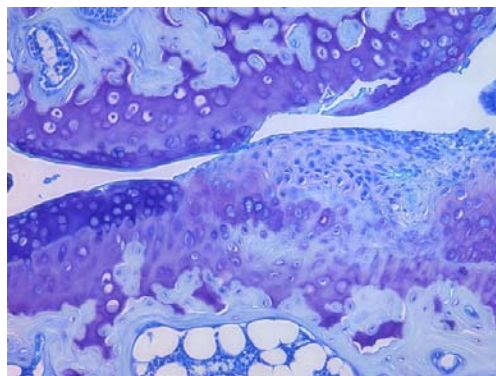


Рис. 5. Повреждение суставной поверхности, штамм 33 (8-я неделя, x20)

При этом наблюдалась выраженная деградация суставного хряща с максимально выраженными признаками ОА (рис.5).

В результате микро-КТ перерезка медиальной мениско-тибиальной связки в обоих штаммах приводила к потере костной массы, хотя у мышей штамма 6 была выявлена большая потеря костной массы во все периоды эксперимента. Кроме того, было обнаружено также увеличение толщины субхондральной костной пластины, которое сопровождалось одновременным выраженным повреждением суставного хряща. Так, у штамма 6, который характеризуется меньшей подверженностью ОА, утолщения субхондральной костной пластинки не наблюдалось, что позволяет заключить, что толщина субхондральной пластины увеличивается компенсаторно, в результате потери суставного хряща.

Характеристика морфологических изменений костей, как считается, является важным фактором в изучении ОА. Микро-КТ была ранее применена с целью изучения костных изменений в различных животных моделях ОА [16, 21, 29]. Так, у мышей с избыточной экспрессией Smad3 в модели ОА наблюдалась дегенерация суставного хряща, при индуцированном ОА, с определением морфометрических параметров кости посредством микро-КТ. При этом были выявлены формирование остеофитов, субхондральный склероз и увеличенная минерализация менисков [41]. У STR/OPT мышей, характеризующихся развитием спонтанного ОА, также был выявлен субхондральный склероз [34, 38].

В модели ОА, вызванного введением коллагеназы у мышей [7], также было показано утончение трабекулярной кости с потерей перегородок в ранних фазах ОА [5]. Конечный период развития ОА [24] был рассмотрен у ADAMTS-5 нулевых мышей в модели ОА, вызванного перерезкой связки медиального мениска, при этом удаление ADAMTS-5 гена предохраняло хрящ от дегенерации [4]. Данные исследования также четко показывают, что потеря костной массы в начале является реакцией на травму, и последующее утолщение субхондральной кости происходит только после значительной дегенерации суставного хряща. Данные результаты подтверждаются множеством других исследований, где потеря костной массы была зафиксирована у собак [6] и людей [10, 23, 32, 40] после травмы коленных связок.

Заживление ушного дефекта редко наблюдается у млекопитающих. Регенерация ушных тканей была впервые описана у мышей штамма MRL/MpJ, подобная способность была описана у менее развитых позвоночных [15, 26, 27, 39]. Некоторые из рекомбинантных штаммов, полученных в результате скрещивания LG/J и SM/J линий мышей, были изучены с целью выявления конкретных областей генома, ответственных за рост [13], длину трубчатых костей [25], толщину и строение кости в поперечном разрезе [35], развитие ожирения [14] и ответной реакции организма на жирную пищу [11, 12].

В данном исследовании впервые демонстрируются морфологические изменения хрящевой и костной ткани в течении ОА в генетически выведенных штаммах мышей с различной степенью восприимчивости к ОА. Менее выраженные поражения суставного хряща у штамма 6 наблюдаются, скорее всего, из-за его повышенной регенеративной способности в сравнении со штаммом 33.

Таким образом, изучение развития ОА выявило большую устойчивость мышей штамма 6 к ОА и выраженную способность к регенерации ушных тканей, а также суставного хряща, в то время как у мышей штамма 33 развивается ОА со значительным поражением суставного хряща и утолщением субхондральной кости, соответственно данные животные не способны восстанавливать поврежденный суставной хрящ или ткани уха.

Полученные результаты указывают на наличие определенных генетических факторов, потенциально связанных с процессами регенерации хрящевой и костной ткани и ответственных за развитие ОА. Данные исследования доказывают, что генетически различающиеся рекомбинантные чистокровные линии мышей различаются также по своей восприимчивости к ОА, предоставляя возможность определить конкретные регионы генома, ответственные за развитие ОА, пересекающиеся с участками, обеспечивающими регенерацию хрящевой ткани.

Данное исследование было финансировано программой Фулбрайта при поддержке Бюро по вопросам образования и культуры Госдепарта-

мента США и осуществлено в Университете им. Вашингтона, США, а также в университете Суонси, Великобритания, при поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки РА(тематическое финансирование 13-3A042).

Поступила 29.08.14

**Հետվնասվածքային օսթեոարթրիտի ժամանակ
զարգացող փոփոխությունները հոդի ոսկրային և աճառային
հյուսվածքներում գենետիկորեն մոդիֆիկացված մկների մոտ**

**Ա.Լ. Թորգոմյան, Հ.Կ. Ղամբարյան, Ն.Ս. Հարթենյան, Ա.Վ. Ազնաուրյան,
Դ.Ն. Խուդավերդյան**

Ուսումնասիրությունը ներկայացնում է ինչպես հոդային աճառի, այնպես էլ ոսկրային հյուսվածքի փոփոխությունները օսթեոարթրիտի ժամանակ, որոնք զարգանում են ռեկոմբինանտ մկների մոտ:

Ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ շտամ 6 մկները օժտված են ավելի մեծ դիմադրողականությամբ օսթեոարթրիտի զարգացման նկատմամբ, ինչի մասին վկայում են ականջի վնասված հյուսվածքների և հոդային աճառի արտահայտված վերականգման ունակությունը: Մինչդեռ շտամ 33 մկների մոտ նկատվում է օսթեոարթրիտի զարգացում իրեն բնորոշ հոդային աճառի վնասվածքով և ենթաճառային ոսկրային հյուսվածքի զգալի հաստացումով: Այդ կենդանիների մոտ չի վերականգնվում վնասված հոդային աճառը, ինչպես նաև ականջի հյուսվածքները: Շտամ 33 մկների մոտ առաջացած հոդային աճառի ցայտուն վնասումը համեմատած շտամ 6 մկների հետ, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է շտամ 6 մկների մոտ աճառային և ոսկրային հյուսվածքի առավել արտահայտված վերականգնվելու կարողությամբ: Ուսումնասիրությունը ապացույց է այն բանի, որ գենետիկորեն տարբեր ռեկոմբինանտ մկների շտամները տարբերվում են իրենց զգայունությամբ օսթեոարթրիտի նկատմամբ:

Ուսումնասիրության արդյունքները հնարավորություն են ընձեռում նաև բացահայտելու քրոմոսոմներում տվյալ գեների տեղակայման շրջանները, որոնք պատասխանատու են օսթեոարթրիտի զարգացման և աճառի վերականգնման գործընթացների համար:

Changes in bone and cartilage in the development of post-traumatic osteoarthritis in genetically modified mice

A.L. Torgomyan, H.K. Ghambaryan, N.S. Hartenyan, A.V. Aznauryan, D.N. Khudaverdyan

Cartilage and bone morphological changes occurring during osteoarthritis (OA) in recombinant inbred mice strains with different degrees of susceptibility to osteoarthritis are demonstrated in this study.

The study of OA showed that strain 6 mice have greater resistance to OA and express ability to regenerate ear tissues as well as articular cartilage, while the strain 33 of mice develop OA lesions with significant thickening of the articular cartilage and subchondral bone. These mice are not able to repair damaged articular cartilage or ear tissue. The observed less pronounced destruction of articular cartilage in strain 6 in comparison with strain 33 is most likely due to cartilage high regenerative capacity. This study provides the proof of the fact that genetically different recombinant inbred lines also differ in their susceptibility to OA providing the opportunity to identify specific regions of genome that contribute to variation in OA development and cartilage regeneration.

Литература

1. Aigner T., Kurz B., Fukui N., Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2002;14:578-84.
2. Bedelbaeva K., Snyder A., Gourevitch D. et al. Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107:5845-50.
3. Blankenhorn E.P., Bryan G., Kossenkova A.V. et al. Genetic loci that regulate healing and regeneration in LG/J and SM/J mice. *Mamm. Genome*, 2009;20:720-33.
4. Botter S.M., Glasson S.S., Hopkins B. et al. ADAMTS5^{-/-} mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009;17:636-45.
5. Botter S.M., van Osch G.J., Waarsing J.H., Day J.S. et al. Quantification of subchondral bone changes in a murine osteoarthritis model using micro-CT. *Biorheology*, 2006;43:379-88.
6. Brandt K.D., Myers S.L., Burr D., Albrecht M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum.*, 1991;34:1560-70.
7. Buckwalter J.A., Brown T.D. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2004;7-16.
8. Burr D.B. The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis. *J. Rheumatol., Suppl.*, 2004;70:77-80.
9. Cain E.L., Clancy W.G. Treatment algorithm for osteochondral injuries of the knee. *Clin. Sports Med.*, 2001;20:321e42. *Cartilage*, 2009;17:695-704.

10. Chappard C., Peyrin F., Bonnassie A. et al. Subchondral bone microarchitectural alterations in osteoarthritis: a synchrotron micro-computed tomography study. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006;14:215-23.
11. Cheverud J.M., Ehrich T.H., Hrbek T. et al. Quantitative trait loci for obesity- and diabetes-related traits and their dietary responses to high-fat feeding in LGXSM recombinant inbred mouse strains. *Diabetes*, 2004;53:3328-36.
12. Cheverud J.M., Pletscher L.S., Vaughn T.T., Marshall B. Differential response to dietary fat in large (LG/J) and small (SM/J) inbred mouse strains. *Physiol. Genomics*, 1999; 1:33-9.
13. Cheverud J.M., Routman E.J., Duarte F.A. et al. Quantitative trait loci for murine growth. *Genetics*, 1996;142:1305-19.
14. Cheverud J.M. A simple correction for multiple comparisons in interval mapping genome scans. *Heredity*, 2001;87:52-8.
15. Clark L.D., Clark R.K., Heber-Katz E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1998;88:35-45.
16. Dedrick D.K., Goulet R., Huston L., Goldstein S.A., Bole G.G. Early bone changes in experimental osteoarthritis using microscopic computed tomography. *J. Rheumatol. Suppl.*, 1991;27:44-5.
17. Eltawil N.M., De Bari C., Achan P., Pitzalis C., Dell'accio F. A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009;17(6):695-704
18. Fitzgerald J., Rich C., Burkhardt D., Allen J., Herzka A.S., Little C.B. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008;16:1319-26.
19. Gilbert J.E. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. *Am. J. Knee Surg.*, 1998;11:42-6.
20. Glasson S.S., Chambers M.G., Van Den Berg W.B., Little C.B. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010;18(Suppl 3):S17-23.
21. Glasson S.S. In vivo osteoarthritis target validation utilizing genetically-modified mice. *Curr. Drug Targets*, 2007;8:367-76.
22. Goldring M.B., Goldring S.R. *Osteoarthritis*. *J. Cell Physiol.*, 2007;213:626-34.
23. Hayami T., Pickarski M., Zhuo Y. et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*, 2006;38:234-43.
24. Hunter D.J., Snieder H., March L., Sambrook P.N. Genetic contribution to cartilage volume in women: a classical twin study. *Rheumatology (Oxford)*, 2003;42:1495-500.
25. Kenney-Hunt J.P., Vaughn T.T., Pletscher L.S. et al. Quantitative trait loci for body size components in mice. *Mamm. Genome*, 2006;17:526-37.
26. Leppala J., Kannus P., Natri A. et al. Effect of anterior cruciate ligament injury of the knee on bone mineral density of the spine and affected lower extremity: a prospective one-year follow-up study. *Calcif. Tissue Int.*, 1999;64:357-63.
27. McBrearty B.A., Clark L.D., Zhang X.M. et al. Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998;95:11792-7.
28. Meulendbelt L., Kraus V.B., Sandell L.J., Loughlin J. Summary of the OA biomarkers workshop 2010 e genetics and genomics: new targets in OA. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011;19:1091-4.
29. Muraoka T., Hagino H., Okano T., Enokida M., Teshima R. Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007; 56:3366-74.
30. Murphy E.D., Roths J.B. Autoimmunity and lymphoproliferation: induction by mutant gene *lpr* and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB. In: Rose N.R., Bigazzi P.E., Warner N.L., Eds. *Genetic Control of Autoimmune Disease*. New York: Elsevier; 1979:207-20.
31. Nevitt M.C., Lane N.E., Scott J.C. et al. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum.*, 1995;38:907-16.

-
32. *Patel V., Issever A.S., Burghardt A. et al.* MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens. *J. Orthop. Res.*, 2003;21:6-13.
 33. *Rai M.F., Sandell L.J.* Inflammatory mediators: tracing links between obesity and osteoarthritis. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, 2011;21:131-42.
 34. *Reich M.S., Jarvis J.P., Silva M.J., Cheverud J.M.* Genetic relationships between obesity and osteoporosis in LGXSM recombinant inbred mice. *Genet. Res. (Camb)*, 2008; 90:433-44.
 35. *Spector T.D., Cicuttini F., Baker J., Loughlin J., Hart D.* Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ*, 1996;312:940-3.
 36. *Swagerty Jr D.L., Hellinger D.* Radiographic assessment of osteoarthritis. *Am. Fam. Physician*, 2001;64:279-86.
 37. *Wachsmuth L., Engelke K.* High-resolution imaging of osteoarthritis using microcomputed tomography. *Methods Mol. Med.*, 2004;101:231-48.
 38. *Ward B.D., Furman B.D., Huebner J.L. et al.* Absence of posttraumatic arthritis following intraarticular fracture in the MRL/MpJ mouse. *Arthritis Rheum.*, 2008;58:744-53.
 39. *Wohl G.R., Shymkiw R.C., Matyas J.R., Kloiber R., Zernicke R.F.* Periarticular cancellous bone changes following anterior cruciate ligament injury. *J. Appl. Physiol.*, 2001;91:336-42.
 40. *Wu Q., Kim K.O., Sampson E.R. et al.* Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. *Arthritis Rheum.*, 2008;58(10):3132-44.