



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

دراسة ارتباط DKK1 مع كثافة العظم المعدنية وواصمات تقلب العظم لدى النساء بعد الإياس

Study of DKK1 correlation with bone mineral density and bone turnover rate markers in postmenopausal women

أطروحة قدمت الى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في العلوم الصيدلانية / اختصاص كيمياء حيوية وأحياء دقيقة

إعداد الصيدلانية

أمل يوسف واكيم

مشاركة الأستاذ الدكتور إميل شاهين

إشراف: الأستاذة الدكتورة فايزة القبيلي

1434-2015

بدأ البحث منذ تاريخ 20 / 6 / 2013 حتى 20 / 10 / 2014

الأمكان الذي أنجز فيها البحث:

1. عيادة العظام والمفاصل في مستشفى المواساة الجامعي.

2. مخابر مستشفى المواساة الجامعي.

3. مخبر الدراسات العليا في كلية الصيدلة.

تاريخ مناقشة الرسالة: 2015/8/12

أسماء أعضاء لجنة الحكم:

برئاسة الدكتورة : أ.د. فايزة القبيلي

الفاحص الأول: د. تغريد حمود

الفاحص الثاني: د. المعتصم بالله زيتون

الإهداء

إلى من قدم حياته ليرانا في أحسن المراتب وأفنى عمره كي يبني عمرنا ومستقبلنا أبي الغالي

التي كانت معي في كل لحظة من مشواري الطويل، حبها يغمرني ودعاؤها يحميني أمي الحبيبة

أحبوني بصدق وتمنوا نجاحي دائماً إخوتي الأعزاء

ملاكي الصغير غابرييل

إلى روح سكنت روحي وكانت دائماً مصدر الأمان والدعم والحب زوجي الحبيب

رفاق دربي وأصدقاء لحظات الفرح والحزن رنيم ومريم مارال وسلاف

وأخيراً إلى وطني الجريح سوريا

كلمة الشكر

الحمد لله الموفق والمعين الذي أسبغ علي من عطائه وأسبل علي من نعمه وأمدني بأناس كثيرين أخص منهم بالشكر الجزيل:

الأستاذة الدكتورة فايزة القبيلي :

التي لم تبخل علي بتوجيهاتها ونصحها ورعايتها خلال سنوات دراستي وأقدر جلياً متابعتها الحثيثة لي أولاً بأول خلال السنوات التي قضيتها في القسم وكل الشكر لها على بصماتها الواضحة في جميع ثنايا هذه الأطروحة ...

كما أتقدم بالشكر الجزيل والفائق التقدير للأستاذة أعضاء لجنة الحكم :

الدكتورة تغريد حمود والدكتور المعتصم بالله زيتون

لتكرمهما بقبول تحكيم هذه الأطروحة .. فلي الشرف بملاحظتهما القيمة وتوجيهاتهما السديدة التي تهدف بكل تأكيد للرفع من السوية العلمية لهذا البحث..

وأقف إجلالاً واحتراماً أمام الصرح العلمي الشامخ : جامعة دمشق

تلك المنارة العلمية الشامخة والصامدة رغم كل الصعاب والظروف وبإذن الله سيبقى بريقها العلمي أخذاً...

وأتوجه بالتقدير والشكر والعرفان إلى : كلية الصيدلة بجامعة دمشق

ممثلة بعميدها الأستاذ الدكتور عبد الحكيم نتوف ونائب العميد للشؤون الإدارية الاستاذة الدكتورة جمانة الصالح

لمحة موجزة عن حياة الباحث

الاسم : أمل يوسف واكيم

حصلت على شهادة الثانوية العلمية من الجمهورية العربية السورية في عام 2003

حصلت على درجة الإجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلانية من كلية الصيدلة في جامعة دمشق عام 2008م بتقدير جيد جداً.

سجلت في درجة الماجستير في التشخيص المخبري/ قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

أنجزت أطروحة عن دراسة ارتباط DKK1 مع كثافة العظم المعدنية وواصمات تقلب العظم لدى النساء بعد الإياس، لنيل درجة الماجستير في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة بجامعة دمشق عام 2015 م.

قمت بالمساعدة في الإشراف على الجلسات العملية في المخابر التابعة لقسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة بجامعة دمشق خلال فترة البحث.

تصريح

الاسم الكامل: أمل يوسف واكيم

مكان وتاريخ الولادة: دمشق 1985

عنوان البحث باللغة العربية: دراسة ارتباط بروتين DKK1 مع كثافة العظم المعدنية وواصمات تقلب العظم لدى النساء بعد الإياس.

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأنني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع.

توقيع الباحث

التاريخ

Table of contents قائمة المحتويات

5.....	قائمة الأشكال الواردة في القسم النظري
5.....	قائمة الجداول الواردة في القسم النظري
6.....	قائمة الأشكال الواردة في القسم العملي
7.....	قائمة الجداول الواردة في القسم العملي
10.....	قائمة الاختصارات
12.....	قائمة المصطلحات

أ. القسم النظري

15.....	مسوغات البحث
16.....	1. مقدمة عامة
18.....	2. استقلاب وفيزيولوجية العظم
18.....	2. 1. بناء النسيج العظمي
23.....	2. 2. التنظيم الهرموني للاستقلاب العظمي
24.....	2. 3. الصياغة وإعادة الصياغة العظمية
24.....	2. 3. 1. الصياغة العظمية
24.....	2. 3. 2. إعادة الصياغة العظمية
26.....	2. 3. 3. ضبط عمل ناقضات العظم
27.....	2. 3. 4. العوامل المنظمة لتمايز البانيات العظمية
30.....	2. 3. 5. Dickkopf related protein-1 (Dkk-1)
30.....	2. 3. 5. 1. الخصائص الفيزيائية والبنوية لعائلة DKK
31.....	2. 3. 5. 2. تطور جينات DKK
32.....	2. 3. 5. 3. تعديل إشارة Wnt
33.....	2. 3. 5. 4. مستقبلات DKK

- 34..... دور DKK في السرطان. 2. 3. 5. 5.
- 34..... دور DKK في التشكل العظمي. 2. 3. 5. 6.
- 36..... تنظيم بانيات وناقضات العظم. 2. 3. 5. 7.
- 37..... الواسمات العظمية. 2. 4.
- 38..... واصمات التشكل العظمي. 2. 4. 1.
- 44..... واصمات الارتشاف العظمي. 2. 4. 2.
- 48..... تخلخل العظم. 3.
- 48..... مقدمة عامة. 3. 1.
- 48..... التوزيع الديموغرافي لمرضى تخلخل العظم. 3. 2.
- 49..... تشخيص تخلخل العظم. 3. 3.
- 49..... الوسائل الاستقصائية في تخلخل العظم. 3. 3. 1.
- 53..... القصور في تشخيص تخلخل العظم. 3. 3. 2.
- 54..... هدف البحث. 4.

II. القسم العملي

- 56..... المواد والطرق. 1.
- 56..... أفراد الدراسة. 1. 1.
- 59..... الاعتيان. 1. 2.
- 59..... الطرق. 1. 3.
- 59..... تعيين منسب كتلة الجسم BMI. 1. 3. 1.
- 59..... مقايسة بروتين DKK-1 البشري. 1. 3. 2.
- 64..... مقايسة الأوستيوكالسين البشري. 1. 3. 3.
- 68..... مقايسة بروتين CTx-1 البشري. 1. 3. 4.

2. الدراسة الاحصائية.....70
3. النتائج.....71
3. 1. تعيين مقدار الكثافة العظمية بحسب T-score.....71
3. 1. 1. دراسة تأثير موقع القياس على قيم الكثافة العظمية حسب T-score وفقاً للمجموعة المدروسة.....72
3. 1. 2. دراسة العلاقة بين عمر المريضة ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.....73
3. 1. 3. دراسة العلاقة بين قيم BMI ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score وفقاً لموقع القياس في عينة البحث.....75
3. 2. دراسة درجة تخلخل العظم حسب T-score.....75
3. 2. 1. نتائج تحديد درجة تخلخل العظم في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.....75
3. 2. 2. دراسة تأثير موقع القياس على درجة تخلخل العظم حسب T-score وفقاً للمجموعة المدروسة.....76
3. 2. 3. دراسة العلاقة بين عمر المريضة ودرجة تخلخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.....78
3. 2. 4. دراسة العلاقة بين قيم BMI ودرجة تخلخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.....79
3. 3. دراسة مقدار الكثافة المعدنية للعظم حسب قيمة BMD.....79
3. 3. 1. نتائج قياس قيم BMD وفقاً لموقع القياس.....79
3. 3. 2. دراسة تأثير موقع القياس على قيم BMD وفقاً للمجموعة المدروسة.....80
3. 4. دراسة العلاقة بين قيم T-score وقيم BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.....81
3. 5. دراسة نتائج مقاييسات DKK-1 و OC و CTx-1 المجراة لمريضات عينة البحث.....83
3. 5. 1. نتائج قياس كل من DKK-1 و OC و CTx-1 في عينة البحث.....83

3. 5. 2. دراسة العلاقة بين عمر المريضة وكل من DKK-1 و OC و CTx-1 في عينة البحث.....	83
3. 5. 3. دراسة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وكل من DKK-1 و OC و CTx-1 في عينة البحث.....	84
3. 5. 4. دراسة العلاقة بين قيم DKK-1 و OC و CTx-1 المقاسة في عينة البحث.....	85
3. 5. 5. دراسة العلاقة بين قيم DKK-1 و OC و CTx-1 المقاسة والكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس	91
3. 5. 6. دراسة العلاقة بين قيم DKK-1 و OC و CTx-1 المقاسة ودرجة تآكل العظم..	94
3. 6. دراسة القيمة الإنذارية لكل من DKK-1 و OC و CTx-1.....	96
3. 6. 1. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بالتآكل العظمي حسب T-score في مجموعة المصابات بالتآكل العظمي ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية في عينة البحث.....	96
3. 6. 2. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بقلة عظم حسب T-score في مجموعة المصابات بقلة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية في عينة البحث.....	97
3. 6. 3. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بالتآكل العظمي حسب T-score في مجموعة المصابات بالتآكل العظمي ومجموعة المصابات بقلة عظم في عينة البحث.....	98
4. المناقشة	99
5. الاستنتاجات.....	105
6. المقترحات والتوصيات	105
7. الملخص.....	106
8. الملحق	108
III. المراجع.....	109

قائمة الأشكال الواردة في القسم النظري

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
20	الخلايا العظمية، تبعاً لمكان توضعها في بنية العظم.	الشكل 1
22	بنية العظم تشريحياً	الشكل 2
25	عملية إعادة صياغة العظم	الشكل 3
27	الإشارات التنظيمية بين بانيات وناقضات العظم	الشكل 4
27	الإشارات التنظيمية بين المطرس العظمي والبانيات العظمية	الشكل 5
29	سبيل إشارة Wnt	الشكل 6
30	المجالات البنيوية في عائلة بروتينات DKK	الشكل 7
33	مراحل تثبيط سبيل Wnt بواسطة DKK-1	الشكل 8
35	صورة شعاعية لعظام فئران معدلة مفرطة التعبير عن DKK-1	الشكل 9
37	دور DKK-1 في تنظيم البانيات والناقضات العظمية	الشكل 10
40	بنية الأوستيوكالسين	الشكل 11
43	تأثير الأنسولين على البانيات العظمية وتنظيم توافر ucOC	الشكل 12
47	تعديلات الكولاجين نمط 1	الشكل 13
48	مقارنة بين عظام متخلخة وعظام سليمة	الشكل 14

قائمة الجداول الواردة في القسم النظري

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
52	درجة تخلخل العظم اعتماداً على مقياس T	الجدول 1

قائمة الأشكال الواردة في القسم العملي

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
57	النسبة المئوية لتوزع المريضات في عينة البحث تبعاً لدرجة البدانة.	الشكل 1
58	استمارة البحث المستخدمة للحصول على بيانات كل فرد من أفراد الدراسة.	الشكل 2
63	عتيدة DKK-1 لشركة Biotechnology company لشركة Sun RED الصينية.	الشكل 3
72	متوسط مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الشكل 4
74	انتشار قيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في منطقة الورك وفقاً لقيم عمر المريضة (بالأعوام).	الشكل 5
76	النسبة المئوية لدرجة تخلخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الشكل 6
80	متوسط مقدار الكثافة المعدنية للعظم حسب BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الشكل 7
82	انتشار قيم BMD وفقاً لقيم T-score في فقرات الظهر.	الشكل 8
83	انتشار قيم BMD وفقاً لقيم T-score في منطقة الورك.	الشكل 9
86	انتشار قيم تركيز CTX-1 وفقاً لقيم تركيز OC في عينة البحث.	الشكل 10
88	انتشار قيم تركيز OC وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.	الشكل 11
90	انتشار قيم CTX-1 وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.	الشكل 12
93	انتشار قيم T-score في فقرات الظهر وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.	الشكل 13
93	انتشار قيم T-score في منطقة الورك وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.	الشكل 14

قائمة الجداول الواردة في القسم العملي

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
56	الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لأعمار المريضات (بالأعوام) ولقيم منسب كتلة الجسم BMI.	الجدول 1
57	توزع المريضات في عينة البحث تبعاً لدرجة البدانة.	الجدول 2
71	الدرجات المعتمدة لتخلخل العظم في عينة البحث والقيم الموافقة المعطاة لكل درجة.	الجدول 3
72	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لمقدار الكثافة العظمية حسب T score في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس (فقرات الظهر أو الورك).	الجدول 4
73	نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في فقرات الظهر ومتوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في عظم الفخذ في عينة البحث.	الجدول 5
73	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 6
75	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 7
75	نتائج تحديد درجة تخلخل العظم في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 8
77	الرتب ذات الإشارة الجبرية لدرجة تخلخل العظم حسب - T score في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس.	الجدول 9
77	نتائج اختبار Wilcoxon للرتب ذات الإشارة الجبرية.	الجدول 10
78	نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 11

79	نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة تخلخل العظم، حسب - score T في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 12
80	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لمقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس.	الجدول 13
81	نتائج اختبار T-student للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط قيم الكثافة المعدنية للعظم BMD في فقرات الظهر ومتوسط BMD في منطقة الورك في عينة البحث.	الجدول 14
81	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين الكثافة العظمية حسب T-score و BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 15
83	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 16
84	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 17
85	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مشعر كتلة الجسم BMI وقيم كل من تركيز البروتين OC ، CTX-1 وتركيز البروتين DKK1 في عينة البحث.	الجدول 18
85	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 19
87	نتائج اختبار تحليل التباين ANOVA ونتائج حساب قيم معامل التحديد R2 بين تركيز OC وتركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 20
88	نتائج حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار بين تركيز OC و تركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 21
89	نتائج اختبار تحليل التباين ANOVA ونتائج حساب قيم معامل التحديد R2 بين CTX-1 و تركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 22

90	نتائج حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار بين قيم CTX-1 و تركيز DKK1 في عينة البحث.	الجدول 23
91	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 24
92	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 25
92	نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز DKK1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 26
94	نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين تركيز OC ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 27
95	نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.	الجدول 28
96	نتائج حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية.	الجدول 29
97	نتائج حساب مقدار المساحة تحت المنحني في مجموعة المصابات بقلّة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية.	الجدول 30
98	نتائج حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة المصابات بقلّة عظم.	الجدول 31

Abbreviations قائمة الاختصارات

AGEs	Advanced Glycation End products
BMD	Bone mass density
BMI	Body Mass Index
Bmps	Bone morphogenetic proteins
BMUs	Basic multicellular units
BRUs	Bone-remodulating units
BSAP	Bone Specific Alkaline Phosphatas
CRD	Cystien Rich Domain
CTx	Carboxy terminal telopeptide of type 1 collagen
DHLNL	Dihydroxylysinornorleucine
DKK-1	Dikkopf related protein-1
DKKL-1	Dickkopf like protein-1
DPD	Pyridinium crosslink deoxypyridinoline
Dsh	Dishevelled protein
DXA	Dual x-ray absorbtometry
FEM	Finite element method
FRAX	Fracture risk assessment tool
Fzd	Frizzled
Gla	Gamma-carboxyglutamic acid
HAP	Hydroxyapatite
HLNL	Hydroxylysinonorleucine
ICTP	Type 1 collagen crosslinked telopeptide
KD	Kilo Dalton
LIF	Leukemia inhibitory factor

LRP	low density lipoprotein receptor protein
NTx	Amino terminal telopeptide of type 1 collagen
OHP	Hydroxyproline
OSM	Oncostatin M
OPG	Osteoprotegerin
PG	Prostaglandin
PICP	Carboxy-terminal Propeptides of Type 1 Collagen
PINP	Amino-terminal Propeptides of Type 1 Collagen
PTH	Parathyroid hormone
PYD	Pyridinium crosslink pyridinoline
QCT	Quantitative computed tomography
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL	Ligand for receptor activator of nuclear factor κ B
Sgy	Soggy
TGF β	Transforming growth factor β
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
ucOC	Undercarboxylated
WHO	World health organization
Wnt	Wingless and Integration-1

Table of Terms قائمة المصطلحات

Advanced Glycation End products	النواتج النهائية للغلوكزة المتقدمة
Amino terminal telopeptide of type 1 collagen	النهاية الأمينية للبيتيد الانتهائي في الكولاجين نمط-1
Body Mass Index	منسب كتلة الجسم
Bone formation markers	واصمات التشكل العظمي
Bone matrix	المطرس العظمي
Bone Specific Alkaline Phosphatas	الفسفاتاز القلوية العظمية
Bone turnover rate	معدل التقلب العظمي
Bone turnover markers	واصمات التقلب العظمي
Cancellous bone	العظم الإسفنجي
Carboxy terminal telopeptide of type 1 collagen	النهاية الكربوكسيلية للبيتيد الانتهائي في الكولاجين نمط-1
Circulating Osteocalcin	الأوستيوكالسين الجائل
Colipase domain	ميدان تميم الليباز
Compact bone	العظم المكتنز (المطبق)
Computed tomography	التصوير المقطعي المحوسب
Coupling factor	عامل التقارن
Dual x-ray absorbtometry	مقياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة
Endochondral	داخل غضروفي
Endosteom	السمحاق الداخلي
Haematopoietic bone marrow	خلايا نقي العظم المولدة للدم

cells	
Histomorphometry	التحليل النسيجي الشكلياني
Invitro	في المختبر
Isoforms	أشكال إسوية
Lamella	صُفحة
Membrane - bound receptor complex	معقد استقبال مرتبط بالسطح
Magnetic resonance imaging	تصوير بالرنين المغناطيسي
Membranous	الغشائي
Modelling	صياغة عظمية
Neutralizing antibodies	أضداد مستعدلة
Oseoblasts	الخلايا البانية للعظام
Osteoclasts	ناقضات العظم
Osteoclast stimulating factor	العامل المنشط للخلايا الناقضة
Osteocollagenous fibers	ألياف عظمية كولاجينية
Osteocytes	الخلايا العظمية
Osteogenic precursor cells	الخلايا العظمية الأرومية المولدة للعظم
Osteoid	المكون العضوي المشبه للعظم
Osteomalacia	تليّن عظام
Osteons	العظُمونات
Osteopenia	قلّة عظم
Osteoporosis-pseudoglioma syndrome	متلازمة تخلخل العظام-الورم الدبقي الكاذب
Parafollicular cells	الخلايا جانب الجريبات
Polymorphism	تعدد الأشكال
Precursor cells	الخلايا السليفة
Quantitative computed	التصوير المقطعي المحوسب الكمي

tomography	
Quantitative histology	علم النسيج الكمي
Remodeling	إعادة الصياغة
Resorption lacunae	جُوبَة الارتشاف
Resorption markers	واصمات الارتشاف
Rickets	الرخذ
Type 1 collagen crosslinked	الببتيد الانتهائي المتصالب في
telopeptide	الكولاجين نمط-1
Trabeculars	الترايبق العظمية
Undercarboxylated	ناقص الكرسلة
Woven bone	العظم المحبوك
Volkmann's canals	أقنية فولكمان
WHO	منظمة الصحة العالمية

مسوغات البحث

يعد تداخل العظام مشكلة صحية عامة، مما يوجب تضافر كل الجهود الممكنة لإيجاد حلول لهذا المرض ذو النسبة العالية من الأمراض والوفيات، إما بالتشخيص المبكر أو بالمعالجة الملائمة الفعالة.

ولما كان الأخصائيين المخبريين جزءاً لا يتجزأ من المنظومة الصحية، بالإضافة إلى الشريحة الواسعة من المجتمع التي تقصدهم لاجراء التحاليل الطبية، فيمكن بالتالي الاعتماد على ذلك في خدمة وتحسين الحالة الصحية، لاسيما مع استمرار دخول أجهزة وتقنيات وواصمات حديثة إلى مجال التشخيص المخبري.

فلم لا تتوسع أدواتنا التشخيصية كأخصائيين مخبريين لتشمل أمراضاً صحية عامة كتداخل العظام الذي قد يبدو للوهلة الأولى بعيداً كل البعد عنا، ثم لا نلبث أن نتذكر أننا حلقة وصل ضمن المنظومة الصحية وأن العضوية وحدة واحدة وكل متكامل.

1. مقدمة عامة

العظم هو نسيج ضام متخصص يتكون من مادة متكلسة بين خلوية تسمى المطرس العظمي bone matrix ومن أنماط مختلفة من الخلايا هي: الخلايا العظمية التي تسكن في فجوات ضمن المطرس، الخلايا البانية للعظم والخلايا الناقضة للعظم التي تسهم في ارتشاف النسيج العظمي وإعادة تشكيله.

يتطور العظم عبر عمليتين هما الغشائية membranous، والتي يتطور فيها العظم مباشرة من غشاء النسيج الضام. وداخل غضروفية endochondral التي يتوضع الطراز الغضروفي فيها أولاً ثم يستبدل فيما بعد بالعظم [1].

تخلخل العظم هو مرض هيكل يسمي أحياناً ترقق العظام، يتصف بنقص الكتلة العظمية مع تبدلات في البنية الهندسية المجهرية للعظام، مما يسبب الكسور عند التعرض لأقل رض. ويعد هذا المرض من الأمراض الصامتة latent التي تتطور إلى درجات متقدمة دون أن تظهر أية أعراض. وتعد الكسور الناجمة عن تخلخل العظام مشكلة رئيسية في الصحة العامة لدى النساء بشكل عام والمسنان بشكل خاص، حيث تعاني النساء ضعف ما يعانیه الرجال من الكسور المرتبطة بتخلخل العظم، بسبب الاختلافات الجنسية في خصائص الهيكل العظمي، بالإضافة إلى الفقد العظمي العام عند الإياس، حيث يزداد معدل التناقص بعد الإياس، فيبلغ 2-3% في العظم القشري كل عام بعد مضي 8-10 سنوات على سن اليأس، أما العظم التريبيقي فيتناقص بنسبة 4.8% في العام بعد 5-8 عاماً من بداية اليأس [2].

تجري دراسة تخلخل العظم عبر تعيين الكثافة العظمية (BMD) bone mass density والتي تعد منبئاً يعتد به كثيراً في التقييم. وكل انحراف معياري ما دون القيمة المتوسطة المتوقعة بحسب العمر يضاعف مرتين أو ثلاث مرات من اختطار الكسر مع مرور الوقت.

لقد قدم فريق منظمة الصحة العالمية (WHO) world health organization معايير مطلقة للكثافة المعدنية، على سبيل المثال: إن نقص الكثافة العظمية لدى امرأة أكثر من 2.5 انحراف معياري عن القيمة المتوسطة لامرأة بيضاء بعمر 25 عاماً يجعلها مهياة لحدوث

تخلخل عظم، أما الإناث ذوات الانحراف المعياري بين 1 و 2.5 أدنى من المعيار فيقال أنهن مصابات بقلّة عظم. ومع ذلك فإن نسبة 50% من النساء بعد الإياس يحدث لديهن كسور عظمية مع مستوى BMD أعلى من القيم المحددة من WHO لتخلخل العظام، مما يؤدي إلى الاستنتاج بأن هنالك عوامل أخرى تتدخل في تقييم حدوث كسور عظمية وتخلخل عظم لا تعكسها قيمة BMD [3].

ولقد تبين أيضاً أن الهشاشة العظمية تعتمد على المورفولوجيا والبنية الهندسية للعظام، كما تعتمد على مكونات المطرس العظمي وهذه جميعها لا يمكن تقييمها اعتماداً على قيمة BMD. ولقد لوحظ في تخلخل العظم أن انخفاض قيمة BMD وتبدلات البنية الهندسية الصغيرة للعظام كلاهما مرتبطان بوجود شذوذات في معدل التقلب العظمي Bone turnover rate، لذلك كان من المقترح استخدام واصمات التقلب العظمي بمعزل عن BMD لتقييم حالة تخلخل العظم لدى النساء بعد الإياس [3].

لقد جرى مؤخراً اعتماد واصمات تقلب العظم كعوامل إضافية للتنبؤ باختطار الكسور والاستجابة للعلاج لدى النساء المصابات بتخلخل عظمي بعد الإياس، كون التبدلات الحاصلة على مستوى الخلايا العظمية قد تكون صغيرة جداً ولا يمكن كشفها بواسطة BMD [4].

ولقد أدى التطور في اكتشاف الطرق الحيوية التي تنظم فعالية الخلية العظمية واكتشاف المكونات العضوية للمطرس العظمي إلى تطوير واصمات كيميائية حيوية جديدة، نذكر منها: منتجات السمحاق اللاكولاجينية، شدف الأوستيوكالسين، أنزيمات الارتشاف العظمي كالفسفاتاز المقاومة للحمض والكاتبسين k، منظمات ناقضات العظم (OPG) osteoprotegrin and (RANKL) ligand for receptor activator of nuclear factor κ B، منظمات البانيات العظمية مثل جزيئات سبيل Wnt (Wingless and Integration-1) ومعدلات ما بعد الترجمة لجزيئات المطرس العظمي [5].

كانت معدلات الكولاجين من أهم الجزيئات المكتشفة، حيث يشكل الكولاجين 90% من المطرس العضوي. يخضع الكولاجين نمط 1، مع تقدم العمر والمرض، إلى تعديلات ما

بعد الترجمة قد تكون إنزيمية أو غير إنزيمية، داخل أو خارج الخلية، والتي تنعكس على قوة العظام. ونذكر من هذه التعديلات الروابط المتصالبة بعد عملية إضافة السكر وعملية المصاوغ على جزيئة حمض الأسبارتيك. ولقد وجد أنها تعبر عن مقاومة حدوث الكسور بمعزل عن BMD [5].

كما ذكرنا سابقاً أن سبيل Wnt من أهم سبل تنظيم عمل البانيات العظمية، كما أثبت مؤخراً أنه سبيل هام جداً في فيزيولوجية العظام والمفاصل. ويعد Dickkopf-1 (DKK-1) منظماً سلبياً لهذا السبيل وبالتالي فإنه يلعب دوراً هاماً في حيوية العظام. وإن تثبيط إشارة Wnt بواسطة يؤدي إلى تناقص البناء العظمي [6]. وهذا ما دفعنا في بحثنا إلى دراسة قيمه المصلية ومقارنتها بقيم BMD المقاسة لدى نساء بعد الإياس وربطها بقيم الواصمات العظمية، علماً نتوصل إلى قياس مصلي لبروتين يعبر عن الحالة الصحية للعظام ويعكس تخرّبها.

2. استقلاب وفيزيولوجية العظم

إن الدور الرئيسي للهيكل العظمي هو الدعم الميكانيكي للجسم، الاستجابة للضغوط الميكانيكية أو الإشارات الجزيئية الخارجية والمحافظة على الاستقلاب المعدني بشكل طبيعي. تتكون العظام في جسم الإنسان من: الخلايا، المعادن، البروتينات، الجزيئات الكربوية (كالسكاكر والليبيدات). يتكون الجزء المعدني من العظم بشكل رئيسي من بلورات الهيدروكسي أباتيت (HAP hydroxyapatite) ويشكل 60-70% من وزن العظم. أما الطور العضوي فيتكون من 90% من الكولاجين، بروتينات المطرس الأصغر حجماً، البروتينات السكرية والبروتيوغليكان [7].

2. 1. بناء النسيج العظمي

2. 1. 1. الخلايا العظمية Bone cells

يتكون العظم من الخلايا التالية:

Osteogenic precursor cells الخلايا العظمية الأرومية المولدة للعظم

هي خلايا جذعية تمتلك قدرة كبيرة على الانقسام. تتواجد على السطوح الداخلية للسمحاق وعلى السطوح الداخلية للسمحاق الداخلي endosteom.

بانيات العظم Oseoblasts

هي الخلايا المسؤولة عن تشكل العظم، تسهم في تشكيل المطرس العظمي وفي تكلس العظم. وهي تمتلك هيولى ولوعة بالأساس تتناقص مع ضعف النشاط التركيبي للخلية، تمتلك العديد من المستقبلات للهرمونات والفيتامينات والسيتوكينات، كما أنها تمتلك استطلاات هيولية تؤمن تماسها مع بانيات العظم المجاورة، وهي تسهم في تشكل وارتشاف العظم من خلال تنشيط ناقضات العظم. تبقى بعض الخلايا بعد تكون العظم على السطح الداخلي أو الخارجي، بينما تتحول الخلايا الأخرى إلى خلايا عظمية. وتسمى منطقة المطرس العظمي حديثة التصنيع والمجاورة للبانيات العظمية بالمكون العضوي المشبه بالعظم (osteoid) أو العظماني.

الخلايا العظمية Osteocytes

توجد محاطة بمحفظة في صفائح المطرس العظمي المتكلس. تنقبض هذه الخلايا فلا تعود مائلة الجوف التي تقطنه ضمن المطرس فيأخذ هذا الجوف شكلاً بيضوياً تمتد منه نواتئ خيطية تؤمن التماس بين الخلايا العظمية وتسهل عبور الغذاء ونواتج الاستقلاب بين الأوعية الدموية والخلايا العظمية البعيدة، إذاً هي خلايا ناضجة تدخل في بناء النسيج العظمي من خلال التركيب النجمي المعروف.

ناقضات العظم Osteoclasts

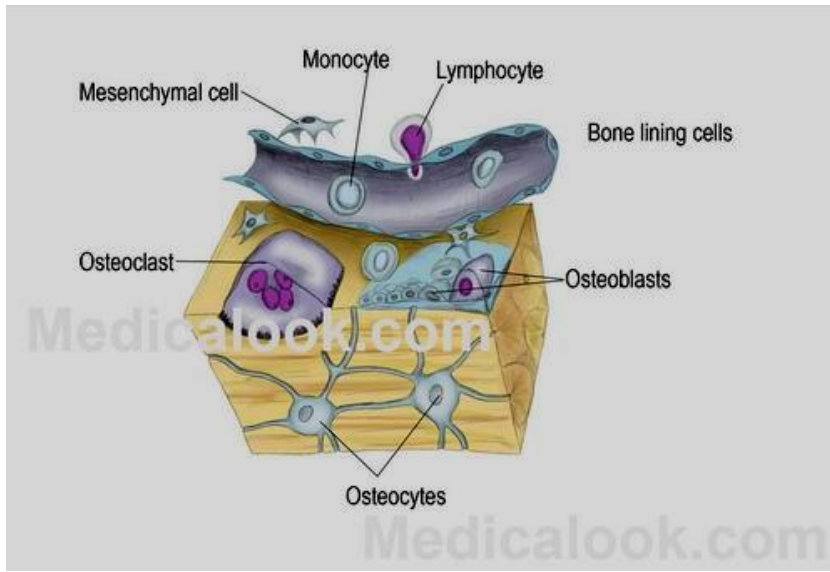
هي خلايا بالعة كبيرة متعددة النوى تمتلك هيولى ولوعة بالحمض، تقوم بإفراز الإنزيمات الحالة للبروتين. وتعمل هذه الخلايا عادة ضمن مجموعات. وهي قادرة على تفكيك كل من العناصر العظمية العضوية وغير العضوية، مما يؤدي إلى تشكل ثقوب أو حفر تآكلية محررة للكالسيوم والفسفور. وتمتلك هذه الخلايا مستقبلات للكالسيتونين التي تؤدي عند تنشيطها إلى تثبيط ارتشاف العظم. وهذه الخلايا لا تمتلك مستقبلاً لهرمون PTH الذي ينشط المستقبلات المتوضعة على الخلايا البانية للعظم والتي تقوم بدورها بإفراز العامل

المنشط للخلايا الناقضة Osteoclast stimulating factor, الذي ينشط بدوره الخلايا الناقضة. كما تمتاز هذه الخلايا بأنها تختفي بعد انتهاء عملها.

خلايا نقي العظم المولدة للدم Haematopoietic bone marrow cells

هي الخلايا المسؤولة عن تكوين الخلايا الدموية [8].

ويوضح الشكل 1 مكان توضع الخلايا العظمية المذكورة سابقاً.



الشكل 1: الخلايا العظمية، تبعاً لمكان توضعها في بنية العظم [9].

2. 1. 2. تطور النسيج العظمي من العظم المحبوك Woven bone

يتواجد هذا العظم في كل من البنى العظمية الجنينية وفي مراحل شفاء الكسور. يتكون من نسيج عظماني osteoid، وهو عبارة عن نسيج خلالي غير معدن مع نسيج خلالي معدن مكون من توضع غير منتظم لالياف الكولاجين. وتتكون اللحمية من نسيج ليفي وعائي ارتكاسي. يجري مع نضج العظم نشر النسيج العظماني بشكل متراكم ليشكل بنية صفيحية تتواجد في العظم الاسفنجي cancellous bone. يؤدي استمرار نشاط بانيات العظم إلى تكلس الترايبك العظمية Trabeculars في المادة العظمية الأساسية، التي تزداد ثخانة من أجل تشكيل العظم المكتنز compact bone. يؤدي استمرار نشاط البانيات العظمية إلى زيادة في المطرس العظمي. وتُظهر البنى الصفيحية زيادة في التنظيم،

إذ يزداد ارتباطها مع بعضها أكثر من النسيج الإسفنجي. وتتشكل الخلايا العظمية عندما تنحصر الخلايا البانية للعظم في المطرس. ومهمة هذه الخلايا المحافظة على مستوى جيد من الكالسيوم والفسفور في المطرس العظمي. وتمتلك هذه الخلايا العديد من الأوعية التي تصلها مع الخلايا المجاورة مما يساهم في تبادل الاتصال الهرموني والشاردي من الأوعية الدموية إلى الخلايا بشكل عام.

3.1.2. العظم الإسفنجي Cancellous bone

هو عظم غني بالمسامية (50-90%) ويختلف عن العظم المكنز بأن بنية الأساسية هي الترايبق العظمية وليس العظونات. والترايبق العظمية هي عبارة عن أشواك عظمية شبيهة بالإبر تتواجد بينها الخلايا العظمية. يتوضع العظم الإسفنجي بين طبقتين من العظم المكنز بشكل مشابه تماماً للشظيرة. وهو يعد أكثر مقاومة من العظم المكنز ويقوم بنشر وتوزيع الطاقة من الحمولات المفصلية المحتكة. يساهم العظم الإسفنجي بحوالي 20% من الكتلة الهيكلية الكلية ضمن الجسم ويملك مساحة سطحية أكبر من الهيكل العظمي مقارنة مع العظم المكنز.

4.1.2. العظم المكنز (المطبق) Compact bone

تتواجد فيه كل الأستيونات Osteons ونظام الأوعية الهافرسية التي تلعب دوراً هاماً في إعطاء النسيج العظمي القوة والصلابة، تتراوح مساميته بين 5-10%. يتكون هذا النظام من 5-20 طبقة أو صفائح lamella تتوضع حول القناة الهافرسية التي تحتوي وعاءاً دموياً. وتتصل هذه الأوعية الهافرسية مع بعضها بنظام أوعية عرضية يسمى أوعية فولكمان Volkmann's canals، التي تساهم في التبادل الغذائي مع البنى السحاقية.

5.1.2. المَطْرَس العظمي Bone matrix

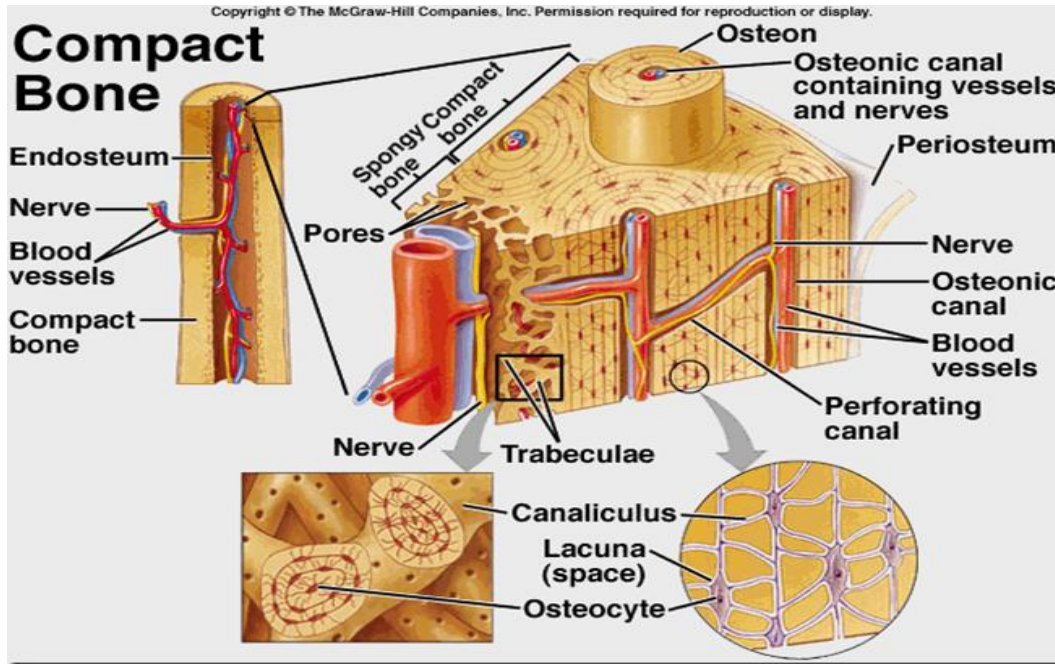
يشكل الماء حوالي 20% من وزن العظم. وتتشكل المواد العضوية حوالي 30-35% من الوزن الجاف للعظم، مثالها: ألياف الكولاجين، غليكوزأمينوغليكان (سلفات الكونديتين وحمض الهيالورونيك وسلفات الكيراتين التي تؤمن قوة النسيج)، بينما تشكل المواد غير العضوية حوالي 65-70% من الوزن. النمط السائد من الكولاجين في النسيج العظمي هو

نمط 1، الذي يمتلك العديد من الروابط بين الجزيئات، بخلاف الكثير من الأنواع الأخرى، مما يزيد القوة النسيجية وعدم القدرة على التمدد والانتباج.

كما يوجد في المطرس العظمي منتجات الخلايا البانية، الأوستيوبونتين والأوستيوكالسين Osteocalcin and osteopontin التي ترتبط بحمض الهيلورونيك H.A وتنشط تحرير مستقبلات فيتامين د: 1 α 25-dihydroxycholecalciferol التي يُحتمل أنها تساهم في نقل الاشارات بين البانيات والناقضات العظمية.

وتتكون العناصر اللاعضوية من 85% فسفات الكالسيوم، 10% كربونات الكالسيوم، 5% مشتقات الفلور، مثل فلوريد الكالسيوم وفلوريد المغنيزيوم وعناصر أخرى زهيدة. تتوضع فسفات الكالسيوم في الثقوب بين الالياف الكولاجينية أثناء عملية التمعدن العظمي، تزداد العلاقة النسبية بين هذه العناصر الععضوية وغير الععضوية مع المطرس العظمي ولكنها تضطرب في بعض الحالات المرضية [1].

ويوضح الشكل 2 البنية التشريحية للطبقات العظمية.



الشكل 2: بنية العظم تشريحياً: وتبدو فيه البنية الدقيقة للعظم الاسفنجي وفيه الترابيق العظمية والعظم المكتنز وفيه الأقتنية الهافرسية [10].

2.2. التنظيم الهرموني لاستقلاب العظام

من أهم الهرمونات المنظمة لاستقلاب العظام نذكر:

- هرمون الدريقات Parathyroid hormone (PTH): يؤدي نقص كالسيوم الدم إلى إفراز هذا الهرمون، الذي يقوم بدوره بتنشيط بانيات العظم التي تفرز العامل المنشط للناقضات وبالتالي تنشيط الانحلال العظمي، كما أنه يقوم بتنشيط الامتصاص الكلوي للكالسيوم وإنتاج الكلية للشل الفعال للفيتامين $1\alpha 25\text{-dihydroxycholecalciferol D}$ الذي ينشط الامتصاص المعوي للكالسيوم.

- الكالسيتونين: يُفرز من الخلايا جانب الجريبات parafollicular cells في الغدة الدرقية عندما يرتفع الكالسيوم الدموي، وهو يتأثر بتنشيط العمليات الخلوية المعتمدة على الكالسيوم ويُستخدم في معالجة تخلخل العظم. (يثبط الخلايا ناقضات العظم).

- فيتامين د: يحرض هذا الفيتامين الامتصاص المعوي والكلوي للكالسيوم. و يؤدي نقصانه إلى نقصان امتصاص كالسيوم وفسفور الدم. هذا النقصان يؤدي إلى الرخد Rickets لدى الأطفال وتلين العظام Osteomalacia لدى الكبار.

- بعض العناصر الهرمونية والشاردية والفيتامينات: يؤخر نقص فيتامين C تصنيع الكولاجين، مثبطاً صيانة الألياف العظمية الكولاجينية Osteocollagenous fibers وتصنيع العظم. كما أن نقص فيتامين A يثبط إنتاج النسيج العظماني من بانيات العظم ويثبط الارتشاف، وبالتالي تؤدي زيادته إلى زيادة الارتشاف العظمي. وإن الهرمونات المفرزة من الفص الأمامي للنخامى (مثل هرمون النمو) تحرض انقسام الخلايا وتحولها إلى خلايا غضروفية، ويؤدي فرط إفراز هذه الهرمونات إلى فرط نمو (إما ضخامة نهايات إذا حدثت بعد اكتمال البلوغ أو عملاقة إذا حدث فرط الإفراز قبل اكتمال البلوغ. أما بالنسبة للستيرويدات فلقد أظهرت الدراسات إن إعطاء التستوستيرون أو ديهيدروستيرويديون أو أندروستيرويديون للفئران أدى إلى زيادة في العظم القشري، كما أظهرت الدراسات أن $\beta 17$ estradiol يزيد من تكاثر بانيات العظم ومن تصنيع الكولاجين في المختبر invitro

[11]

3.2. الصياغة وإعادة الصياغة العظمية

1.3.2. الصياغة العظمية Modelling

تستمر عملية تشكل وارتشاف العظم خلال فترة الحياة، وتختلف سرعتها بحسب مرحلة النمو، حيث أنها تكون أسرع خلال مرحلة نمو الهيكل العظمي وتدعى هذه المرحلة بمرحلة التشكل Modeling. وهي مرحلة تستمر من بداية تخلق الهيكل العظمي خلال المرحلة الجنينية وحتى نهاية العقد الثاني من عمر المرء، عندما يتوقف النمو الطولي للعظام.

تعرف الصياغة العظمية بأنها نشاط عظمي سطحي ونوعي، سواء كان توضعاً عظمية أم ارتشافاً، تكون نتيجته تبديلاً في حجم وشكل العظم. وهي عملية ليست ثنائية كإعادة الصياغة، أي أنه ليس بالضرورة أن يترافق فيها الارتشاف بحدوث بناء عظمي. وهي تشير إلى حدوث تبدل معمم في الأبعاد الكلية للمنطقة القشرية والاسفنجية من العظم [12].

2.3.2. إعادة الصياغة Remodeling

تعرف هذه العملية بأنها إعادة بناء داخلي أو مجمل للعظم المتشكل سابقاً. وهي ظاهرة مزدوجة على المستوى النسيجي، يحدث فيها في البداية مرحلة ارتشاف فعال R (resorption)، ثم مرحلة هدوء Q (quiescence) أو انعكاس (reversal) ثم تشكل F (formation). وهي تشمل كل التبدلات الموضعية في عظام العضوية. تستمر هذه العملية خلال حياة البالغ وتتكامل مع نظام استئباب الكالسيوم وتؤمن آلية الإصلاح الذاتي والاستجابة للإجهاد [12].

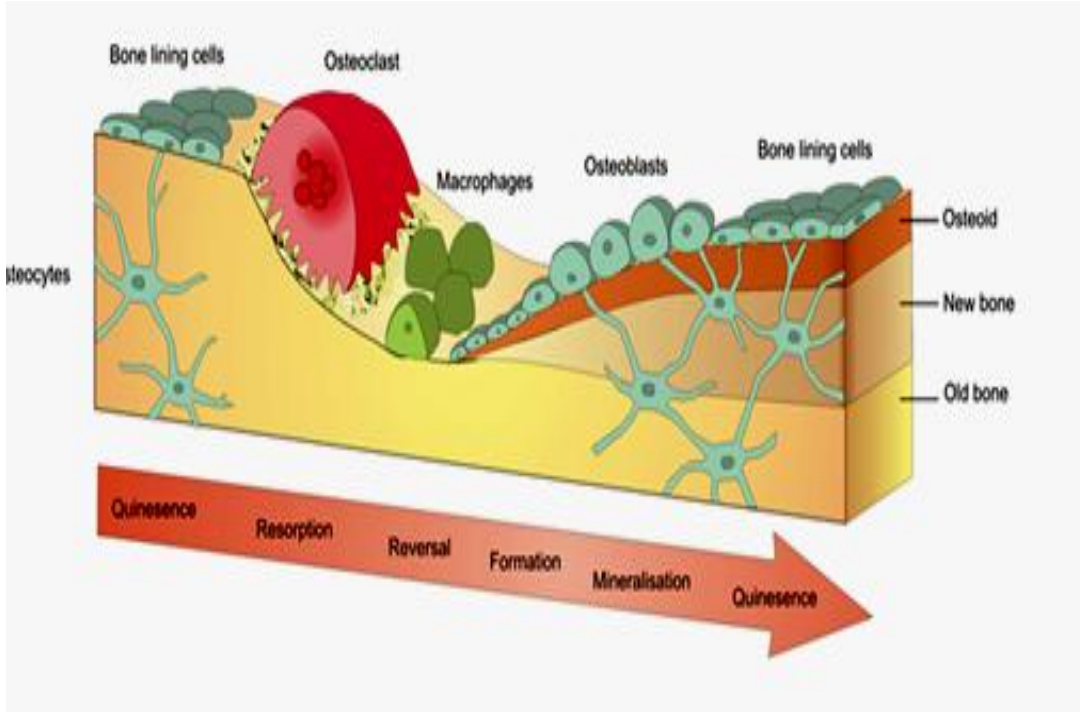
يجري استبدال 20% تقريباً من العظام بشكل دوري تختلف مدته حسب موقع وحجم العظم [13].

يجري استبدال ما يقارب 25% من الترابيق العظمية (حويجزات يفصلها النقي) و3% من القشرة العظمية لدى البالغ كل عام. ومن خصائص هذا الاستبدال إنه لا يحدث بشكل موحد على كامل الهيكل العظمي وإنما يحدث عبر جيوب بؤرية منعزلة تعرف بوحدات التعدد الخلوي الرئيسية لنظام تقلب العظم (BMUs) basic multicellular units. أو bone-remodulating units (BRU) [12].

يبدأ التسلسل الخلوي بارتشاف العظم ويتبع بوضع طبقة مطرسية من قبل بانيات العظم، ثم تتمعدن هذه الطبقة لتعطي العظم الجديد. وتحدث هذه العملية في النقطة ذاتها ولكن بمناطق مختلفة مكانياً وزمنياً على طول الهيكل العظمي.

تجري المحافظة على توازن هذه العملية عن طريق الهرمونات الجهازية وسيتوكينات الخلايا المناعية ومكونات المطرس العظمي، حيث يجري نقل الإشارة من ناقضات العظم إلى بانيات العظم وبالعكس. ولقد أطلق على عملية ارتشاف العظم التي يتبعها تشكل كمية مساوية من العظم **coupling**. إلا أن التبدلات التي تحدث مع النمو والتقدم في السن تثبت أن هذه النظرية نادراً ما تكون صحيحة، فخلال مرحلة النمو هنالك توازن إيجابي في وحدات **BMUs**، بينما يصبح هذا التوازن سلبياً في مراحل العمر المتقدمة. وكذلك في الحالات الاستقلابية، مثل تخلخل العظم الإياسي، وعلى الرغم من حدوث ارتشاف وبناء العظم بنسبة أعلى من النسبة السوية إلا أن كمية العظم المتشكلة ليست مساوية لتلك الكمية المرتشفة وكثافة العظم تصبح أقل [14].

ويبين الشكل 3 عملية إعادة صياغة العظم.



الشكل 3: عملية إعادة صياغة العظم، يتم فيها ارتشاف العظم القديم بواسطة ناقضات العظم وتشكيل نسيج عظماني جديد بواسطة بانيات العظم [15].

2.3.3. ضبط عمل ناقضات العظم The control of osteoclasts

ناقضات العظم Osteoclasts هي الخلايا الوحيدة التي تقوم بالارتشاف. ويتم التحكم بتشكيلها وفعاليتها عبر إشارات تنبعث غالباً من سلالات بانيات العظم وكذلك من الخلايا التائية والبائية، بالإضافة إلى هذه الإشارات وجد عامل رئيسي يعمل موضعياً سمي عامل التقارن Coupling factor لم يتم التعرف عليه حتى الآن بالشكل الكافي، إلا أنه من المقترح أنه يفرز من المطرس العظمي خلال عملية الارتشاف. ولقد أخذ بعين الاعتبار في السنوات الأخيرة وجود عوامل أخرى تعد إشارات تنبعث من ناقضات العظم المفعلة وتلعب دوراً في تحفيز سلالات خلايا بانيات العظم لاستبدال العظم المرتشف في وحدات BMUs. وهذا ما أثبت أن الاتصال داخل الخلوي يحدث في الاتجاهين بين بانيات وناقضات العظم [14].

وهناك هرمونات وسيتوكينات تؤثر في ضبط عمل ناقضات العظم، منها:

- Prostaglandin (PG) يحفز تشكل ناقضات العظم في المزارع الخلوية وذلك بتواسط cAMP.

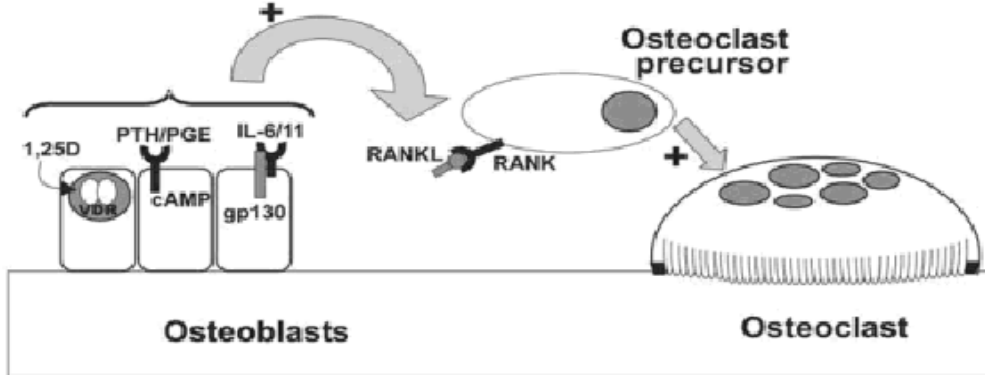
هرمون الدريقات parathyroid hormone (PTH) يحفز عبر الارتباط بمستقبلاته على تشكل ناقضات العظم في مزارع نقي العظم النقية وأيضاً بتواسط cAMP وتدخل interleukin-1 كعامل وسيط.

- الهرمونات الستيرويدية : يحفز ارتباط $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ مع مستقبله وإزفائه translocation إلى النواة عملية انتساح لتنشيط ناقضات العظم في المختبر.

وأخيراً تتدخل مجموعة من السيتوكينات في تنشيط ناقضات العظم عن طريق معقد استقبال مرتبط بالسطح membrane - bound receptor complex هو غليكوبروتين وزنه 130 KDa. ونذكر من هذه السيتوكينات IL-6 مع مستقبله الذواب s IL-6R، IL-11، leukemia inhibitory factor (LIF) و Oncostatin M (OSM).

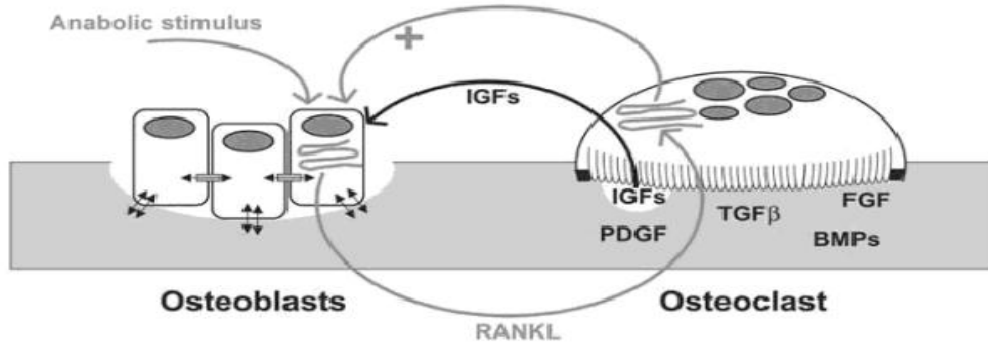
أما بالنسبة للعوامل المثبطة لناقضات العظم فلقد اكتشف Osteoprotegerin (OPG) وهو عامل ذواب من طائفة مستقبلات TNF [14].

- تتبع إشارات من بانيات العظم وتحفز عمل ناقضات العظم عبر آلية تعتمد على التماس بين بانيات العظم وطلائع ناقضات العظم (الشكل 4).



الشكل 4: الإشارات التنظيمية بين بانيات وناقضات العظم [14].

كما وجدت العديد من العوامل التي تفرز من المطرس العظمي وتحفز بانيات العظم وبالتالي تشكل العظم. حيث تقوم ناقضات العظم بارتشاف المطرس العظمي، مما يؤدي إلى تحرر عوامل النمو التي تحفز انقسام طلائع بانيات العظم وتطورها (الشكل 5).



الشكل 5: الإشارات التنظيمية بين المطرس العظمي والبانيات العظمية [14].

2.3.4. العوامل المنظمة لتمايز بانيات العظم

يجري التحكم بتطور أي نسيج وبرنامج تمايز النمط الظاهري لخلاياه عبر شلال من العوامل التنظيمية التي إما أن تكون إيجابية التأثير (محفزة) أو سلبية التأثير (مثبطة)، تسمح هذه العوامل بالتعبير المؤقت عن الجينات. تعمل هذه العوامل والجينات على نضج سلالات الخلايا المولدة للعظام وبالتالي تشكل العظم. وهي تشمل بروتينات إشارات التخلق

المفرزة وعوامل انتساح وعوامل Micro RNAs المكتشفة حديثاً والتي تنظم تشكل العظام في مرحلة المضغ والكتلة العظمية لدى البالغين.

كما تعد إشارات كل من مسلك BMPs\TGF- β ومسلك Wnt signaling من أبرز الإشارات التنموية المسؤولة عن النمط الظاهري لبانيات العظم [16].

سبيل إشارة Wnt

إن سبيل إشارة (Wnt) Wnt signaling pathway هو عبارة عن مجموعة مسالك لتتبع الإشارة تتألف من بروتينات تنقل الإشارة من خارج الخلية، عبر مستقبلات سطح الخلية، إلى الداخل.

جرى وصف مسالك إشارة Wnt كما يلي :

- The canonical Wnt pathway: يؤدي إلى تنظيم الانتساح الجيني.

- The noncanonical planar cell polarity pathway: المسؤول عن شكل الخلية عبر تنظيم الهيكل الخلوي.

- The noncanonical Wnt\calcium pathway: ينظم الكالسيوم داخل الخلية.

يجري تفعيل مسالك Wnt جميعها عبر الارتباط بربيطة بروتينية مع مستقبل تابع لـ Frizzled family، حيث تُمرر الإشارة البيولوجية إلى Dishevelled protein داخل الخلية.

تعمل مسالك Wnt إما عبر تأثير التجاور بين الخلايا أو الاتصال عبر الخلية نفسها، وهي محفوظة تطورياً بشكل جيد أي أنها متشابهة بين الأنواع من ذبابة الفاكهة حتى الإنسان. [17]

وهي مجموعة من البروتينات (بروتينات سكرية شحمية معدلة) المفرزة تشارك في تنظيم تمايز وتكاثر واستماتة الخلايا، وبالتالي تساهم في تطور واستتباب الكائن الحي.

جرى التعرف على هذه البروتينات، في البداية، لدى الذباب والفئران، فهي مسؤولة لدى ذبابة الفاكهة عن جين الأجنحة (Wg) wingless و Int-1 gene مسؤولة عن تطور سرطان الثدي لدى الفئران وقد اشتق الاسم Wnt من هذين الجينين. تحرض هذه

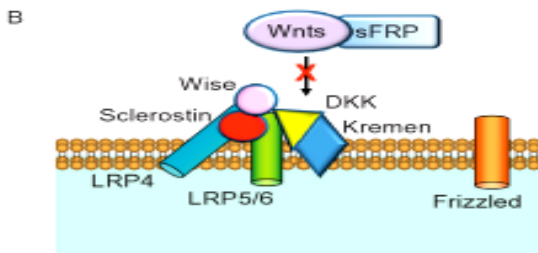
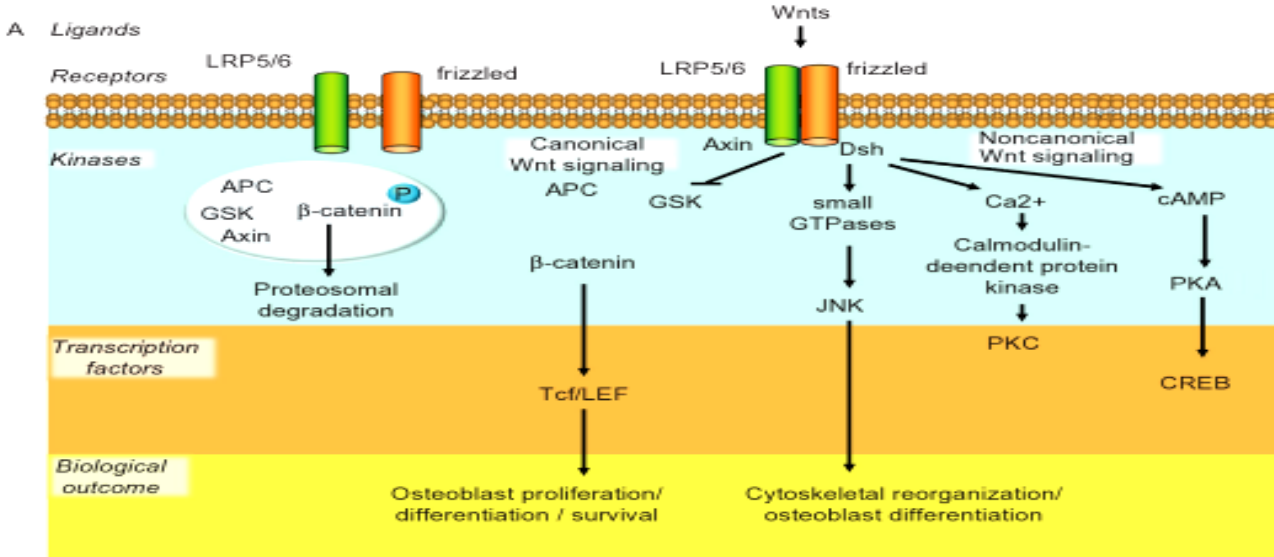
البروتينات إشارات داخل خلوية عبر الارتباط بمستقبل أحد أعضاء Frizzled protien (FZD). كما تتداخل أيضاً مع مستقبل LRP-5 و LRP-6 (low density lipoprotein receptor protein 5,6).

تم التعرف على دور LRP5 عبر إحداث طفرات جينية، حيث أن إحداث طفرة في جين LRP5 يؤدي في النهاية إلى حدوث تخلخل عظام وعمى. كما أن تعدد الأشكال Polymorphism في جين LRP5 يترافق مع انخفاض الكتلة العظمية وزيادة اختطار الكسور في العديد من الدراسات [18]. والعكس بالعكس حيث أن الأفراد الذين ينتجون أشكال طافرة من LRPS غير قادرة على الارتباط بـ dkk-1 (مثبط لسبيل Wnt) يتميزون بكتلة عظمية مرتفعة ومقاومة للكسور [19].

يتطابق LRP-6 بنسبة 70% مع LRP-5، حيث أن الطفرات أو تعدد الأشكال في هذا الجين تؤدي إلى نقص الكتلة العظمية عند الإنسان [20].

مثبطات إشارة Wnt : Inhibitors of Wnt signaling

يتم تنظيم هذا السبيل عبر مجموعة من البروتينات المثبطة: dkk, kremen, sclerostin, secreted Frizzled related protein-4 و Wise protein. وسنتحدث بشكل واسع عن بروتين DKK-1 موضوع دراستنا. ويبين الشكل 6 سبل إشارة Wnt.



الشكل 6: سبيل إشارة Wnt. ويظهر في القسم A مسالك هذا السبيل، بينما يظهر في القسم B مثبطات هذا السبيل. [21].

2. 3. 5. Dkkopf related protein-1 (DKK-1)

2. 3. 5. 1. الخصائص الفيزيائية والبنوية لعائلة DKK

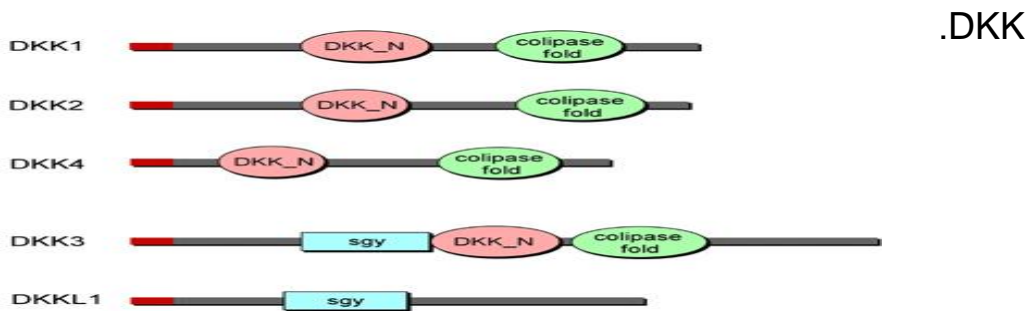
تضم عائلة DKK أربعة بروتينات مفرزة (DKK1- 4) تناهض سبيل إشارة Wnt [22]، كما أن لها أنماط تعبير تختلف بين مرحلة المضغة ومراحل التطور التالي للولادة [23].

هي عبارة عن بروتينات سكرية تتألف من 250-255 حمضاً أمينياً، تزن بين 24-29 KD كيلودالتون للبروتينات 4 وDKK-1,2 and 4 و39 KD للبروتين DKK-3 [24-26].

تحتوي بروتينات DKK لدى الفقاريات مجالين وصفيين غنيين بالسيستئين (CRD-1 and Cystien Rich Domain (CRD-2، مفصولين بمنطقة رابطة متغيرة الطول غير محفوظة تقيس بين 50-55 حمضاً أمينياً في DKK 1,2 and 4 و 12 حمضاً أمينياً في DKK3 وهذين المجالين يمنحان هذه العائلة صفاتها الفريدة، وخارج هاتين المنطقتين يكون تشابه المتواليات قليلاً جداً [24].

ولدى اللافقاريات يتواجد فقط مجال ميدان تميم الليباز colipase domain [27]. ولقد أظهر التحليل البنيوي أن هذا المجال لوحده كافياً لإحداث الفعالية البيولوجية في تثبيط سبيل Wnt [28,29].

تحدث عملية شطر النهاية المطرفية النتروجينية لتتحرر شذفة النهاية المطرفية الكربوكسيلية والتي تحتوي على 10 ثمالات سيستئين ذات صلة بميدان تميم الليباز (colipase domain) [30]. ويظهر الشكل 7 المجالات البنوية لعائلة بروتينات



الشكل 7: المجالات البنوية في عائلة بروتينات DKK [22].

2. 3. 5. 2. تطور جينات DKK

يعد DKK1 العنصر الرئيسي والمميز في هذه المجموعة. ولقد جرى التعرف عليه مسبقاً كمحرض لتشكيل رأس المضغة ومناهض لسبيل Wnt عند القيطم *Xenopus* (جنس من البرمائيات) [24]. يعمل DKK-1 في العديد من النسخ [31]. جرى بعد ذلك التعرف على بقية أفراد عائلة DKK (DKK-2,3and 4) لدى اللافقاريات ولدى الفقاريات ومنها الإنسان [32,33].

لقد أظهر إجراء DNA sequencing لدى الفقاريات وجود تقارب نسبي بين DKK1,2 and 4 أكثر من تقاربهم مع *dkk3* [24].

اكتشف لاحقاً عضواً آخر من هذه العائلة لدى الفقاريات يدعى *soggy* (Sgy) ويسمى أيضاً *DKKL-1* (Dickkopf like protein-1) واعتُبر نديداً فريداً لبروتين *DKK-3* [26].

يلاحظ التشابه بين *DKK1,2 and 4* في المناطق خارج المجال الغني بالسيستئين، الأمر الذي دفع للاعتقاد بأنها نشأت من خلية سليفة واحدة، كما أنها تنظم إشارة *Wnt* عبر ارتباطها بالمستقبل نفسه وبذلك تختلف عن *DKK-3*.

تتوضع جينات *DKK1, 2 and 4* في مواقع معروفة من الصبغي (*DKK1 maps to 10q11, DKK2 to 4q25 and DKK4 to 8p11*)، ويعتقد أن الجينات في هذه المواقع المورثية قد تضاعفت معاً في بداية تطور الفقاريات [35,34]، على النقيض فإن جين *DKK3* تتوضع في الموقع *11p15.3* والذي لا يعد جزءاً من هذه المجموعة الجينية المتوازية.

- تمتلك اللافقاريات جيني *DKK*. أحدها مشابه لجينات *DKK1,2 and 4* لدى الفقاريات والآخر مشابه لجين *DKK-3* [32].

وبالتالي جرى الاستنتاج من هذه الملاحظات حدوث انشطار في *DKK-3* خلال المراحل التطورية الأولية والعديد من تضاعفات الجينات، مما أدى للحصول على فصيلتين من عائلة *DKK* [27].

2.3.5. تعديل إشارة Wnt

إن الدور الأساسي لبروتينات DKK-1, 2 and 4 هو تعديل إشارة سبيل Wnt (Dkks) modulate Wnt signaling) وتغلب على هذا التعديل الطبيعية التثبيطية. ولكن يقوم DKK2 في بعض الأحيان بتحفيز إشارة Wnt. اكتُشف DKK-1 أولاً واكتسب أهميته من قدرته على تثبيط هذا السبيل في مرحلة تشكُّل المضغة عند القيطم Xenopus، الأمر الضروري لتشكُّل الرأس [24].

واكتُشفت بعد ذلك قدرته على تثبيط Wnt عبر تثبيط beta-catenin في العديد من أنماط الخلايا وعند مختلف أنواع الفقاريات [25].

تؤدي إشارات Wnt إلى تفعيل ثلاث سبل عبر تفعيل مستقبلات من نوع Frizzled (مستقبلات عبر غشائية) وهذه السبل هي :

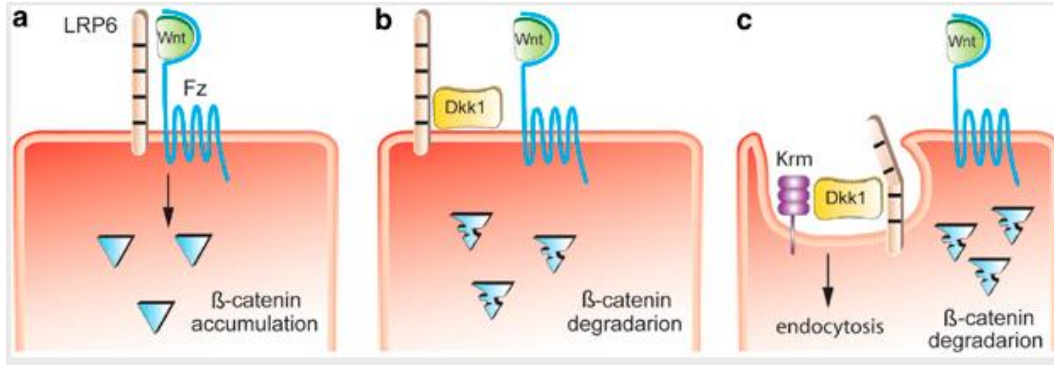
1- السبيل canonical أو Wnt/beta-catenin [36].

2- السبيل planar cell polarity (PCP): وهو لا يتضمن β -catenin ويستخدم جزيئات GTPases من عائلة rho/cdc42 لتفعيل Jun kinase (JNK) [37].

3- الشلال Wnt/Ca²⁺ cascade: والذي ما يزال مثيراً للجدل ويعتقد أنه يتراكم مع سبيل PCP [38].

تؤثر عائلة DKK في السبيل الأول وذلك لأنها ترتبط إلى تميم مستقبل من عائلة lipoprotein receptor-related protein 5/6 [39]، الذي يعد ضرورياً لتوجيه الإشارة ليتفعل β -catenin، حيث يشكل معقداً ثلاثياً مع Wnt و Fz proteins [40].

ويوضح الشكل 8 مراحل تثبيط Wnt بواسطة DKK-1.



الشكل 8: مراحل تثبيط سبيل Wnt بواسطة DKK-1 [42].

a- يشكل Wnt معقداً ثلاثياً مما يؤدي إلى تراكم β -catenin وتفعيل السبيل *the canonical, or Wnt/beta-catenin pathway*

b- يرتبط DKK-1 مع Lrp6 ويمنعه من الارتباط مع معقد Wnt-Fz

c- يؤدي ارتباط DKK-1 مع مستقبله الكريمين إلى تثبيط سبيل Wnt .

3.2. 4. 5. 3.2. مستقبلات DKKs

من مستقبلات DKKs (DKKs receptors) Lrp-5/6، وهو يتبع لدى الفقاريات للبروتينات عبر الغشائية، بوزن جزيئي يقارب 180 KDa. من طائفة مستقبلات البروتينات الشحمية منخفضة الكثافة lipoprotein receptor low-density (LDLR) وتعمل كتميم مستقبل لبروتينات Wnt [39].

ولكن ألفتها لبروتينات Wnt ضعيفة، بينما يرتبط DKK-1 مع Lrp بألفة عالية ويشكل معقداً قابلاً للتأثر مع Wnt-Fz، مما يؤدي إلى حجب تنبيغ الإشارة [41]. ترتبط النهاية المطرفية الكربوكسيلية في Lrp-6 مع DKK-1، بينما ترتبط النهاية الأمينية مع معقد Wnt-Fz [42]. بينما في جزيئة DKK-1 يعد ميدان تميم الليياز كافياً للارتباط بـ Lrp وتثبيط سبيل Wnt، ولقد صنَّع العلماء ببتيداً مشتقاً من ميدان تميم الليياز (-Cys 233 Cys 253) ووجدوا أنه يُحاكي فعالية كامل البروتين في تثبيط Wnt [43]. وهناك نوع آخر من مستقبلات DKK-1 عالية الألفة وهي Kremen 1 and 2، يرتبط بها DKK-1 عبر طية تميم الليياز والتي تعد أيضاً وحدها كافية للارتباط بالكريمين [44].

2. 3. 5. 5. دور DKK في السرطان

يلعب سبيل Wnt دوراً مهماً في السرطان [45] وبالتالي فإن معدلات هذا السبيل تتدخل في هذا الفعل. ولقد أظهر مرضى الورم النقوي المتعدد في أغلب الحالات آفات عظمية مؤلمة، كما أكدت الدراسات مؤخراً زيادة في قيمة DKK-1 في مصول هؤلاء المرضى. وكانت هذه الزيادة مرتبطة بزيادة حدوث الآلام [46].

كما أظهرت الدراسات أن نقي العظم الحاوي على مستويات مرتفعة من DKK-1 ينتبسط فيه تمايز الخلايا السليفة لبانيات عظمية في المختبر. وكان الافتراض أن DKK-1 المنتج من خلايا الورم النقوي يحجب تمايز بانيات العظم، مما يؤدي إلى حدوث آفات عظمية انحلالية. الأمر الذي دعم هذه الفكرة أن معالجة مرضى الورم النقوي المتعدد يترافق مع انخفاض قيم DKK-1 وارتفاع واصمات التشكل العظمي [47].

2. 3. 5. 6. دور DKK في التشكل العظمي

يلعب DKK دوراً في التشكل العظمي، حيث أنه لسبيل Wnt/ β -catenin دوراً هاماً في تشكيل العظم، فهو يحرض على زيادة الكتلة العظمية عبر العديد من الآليات، ومنها تجدد الخلايا الجذعية، تكاثر بانيات العظم، تحريض تكون بانيات العظم، تثبيط ناقصات العظم واستماتة الخلايا العظمية [48].

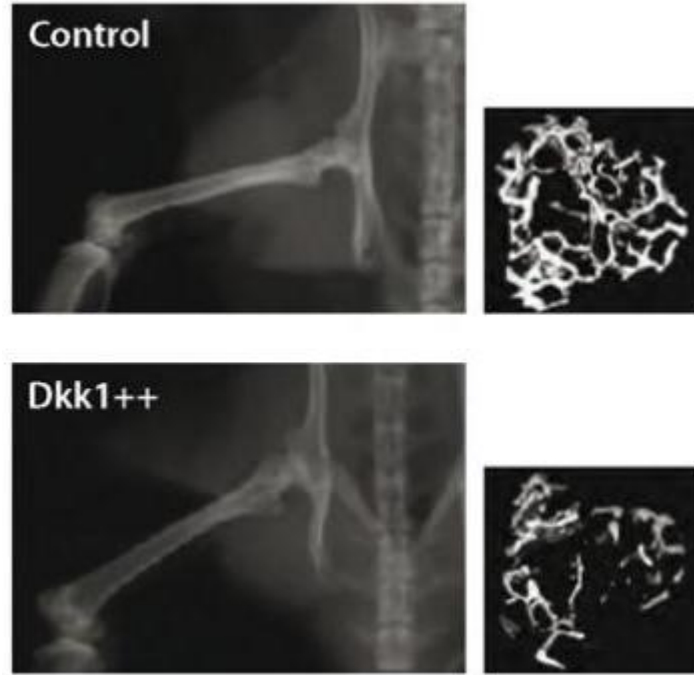
أكدت العديد من الدراسات السريرية أن DKK-1 ينظم الكتلة العظمية عند الإنسان :

- يعد Lrp-5 عنصراً مهماً في تنظيم الكتلة العظمية، حيث أن حدوث طفرات تُفقدته وظيفته لدى الإنسان يؤدي إلى متلازمة تخلخل العظام-الورم الدبقي الكاذب-osteoporosis-pseudoglioma syndrome والتي تتميز بانخفاض الكتلة العظمية [49]، بينما تؤدي الطفرات المحفزة لوظيفة Lrp-5 إلى ارتفاع في الكتلة العظمية ونلاحظ فيها انخفاض الألفة للارتباط مع DKK-1 [50،51]. وبشكل مشابه للإنسان فإن الفئران $Lrp5^{-/-}$ تتمتع بنمط ظاهري ذو كتلة عظمية منخفضة عائد إلى قلة تكاثر الخلايا السليفة precursor cells [52]. وظهرت النتيجة نفسها عند حدوث خسارة لأليل واحد في جين Lrp-6 [53].
وبالعكس فإن التعبير المفرط يؤدي إلى نمط ظاهري ذي كتلة عظمية مرتفعة [54].

أما بالنسبة لطفرات DKK-1 فيمكن تلخيص تأثيرها على الشكل التالي:

- الفئران متغايرة الزيجوت Heterozygous $DKK-1^{+/-}$ عيوشة وتظهر زيادة في الكثافة العظمية المعدنية، دون حدوث تبدلات في الارتشاف العظمي [55]. وإن الكثافة العظمية في العظم التريبيقي والقشري لدى هذا النمط من الفئران تتناسب عكساً مع مستويات التعبير عن DKK-1 [56]. كما تُظهر الفئران المعدلة وراثياً والتي تعبر عن DKK-1 بشكل مفرط حالة قلة عظم osteopenia. أما الفئران $DKK-1^{-/-}$ فتموت فوراً بعد الولادة وتعاني من شذوذات تطورية حادة [57].

- استخدم معزاز الجرذان collagen1 α 1 promoter لانتاج جردان متحولة وراثياً مفرطة التعبير عن DKK-1 (الشكل 9)، فكانت النتيجة انخفاض في عدد البانيات العظمية ومعدل التشكل العظمي ومستويات الأوستيوكالسين المصلية [58,59].



الشكل 9: الفئران المعدلة مفرطة التعبير عن DKK-1 تظهر انخفاضاً في الكتلة المعدنية العظمية والترايبق العظمية مقارنةً مع الشاهد [60].

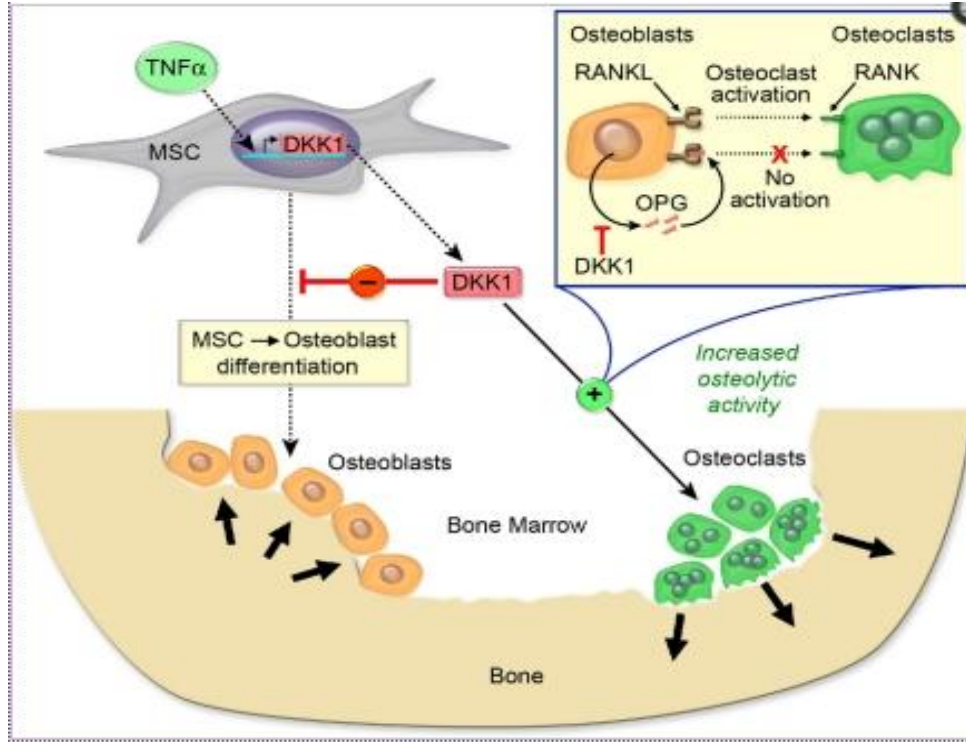
- استُهدف كبح DKK-1 في السنوات الأخيرة كوسيلة علاجية للأمراض العظمية، مما أدى إلى ظهور منظومة من أضداد DKK-1 المُستعدلة neutralizing antibodies،

ولقد أدى استخدام هذه الأضداد لدى الفئران المصابة باورام نقوية متعددة إلى زيادة عدد البانيات العظمية، زيادة مستويات الأوستيوكالسين المصلية وزيادة حجم العظم التريبيقي [61].

- دعمت النتائج السابقة جميعها النظرية التي تقول أن إشارة Wnt/Lrp تخضع للتنظيم السلبي من DKK-1 وبالتالي تنظيم الكتلة العظمية، وهذا ما جعل تداخل DKK-1 مع Lrp هدفاً تشخيصياً أو علاجياً لتطوير أدوية علاجية لتخلخل العظام [62].

2.3.5.7. تنظيم بانيات وناقضات العظم

تنتج البانيات العظمية الأستيوبروتغرين (OPG) والذي يعد مسقبلاً ذوياً ينافس الارتباط بين RANKL-RANK ولذلك فإن النسبة بين OPG و RANKL هي التي تتحكم بالتأثر بين البانيات وناقضات العظمية [63]، حيث أن تثبيط سبيل Wnt يؤدي إلى إيقاف تشكل عظم جديد والحد من التعبير عن OPG وبالتالي انزياح النسبة OPG : RANKL باتجاه الارتشاف العظمي. إذاً يقوم DKK-1 بدورين: 1- يعزز TNF-a إفراز DKK-1، الأمر الذي يثبط اشتقاق البانيات العظمية من الخلايا السليفة MSC فتتخفض مستويات OPG وتكون النتيجة توقف تنمي العظم. 2- يعزز DKK-1 مستويات RANKL فتزداد نسبة RANKL: OPG ويحرض ازديادها فعالية ناقضات العظم والنتيجة تكون بحدوث الارتشاف العظمي (الشكل 10).



الشكل 10: دور DKK-1 في تنظيم البانيات والناقضات العظمية [31].

4.2. الواصمات العظمية The Bone Markers

يجري قياس الواصمات البيولوجية للتقلب العظمي في الدم أو البول. وهي تقسم إلى واصمات التشكل العظمي وواصمات الارتشاف العظمي، وتستخدم في توليفات انتقائية تتضمن واصمات تشكل مع واصمات ارتشاف والتي تعبر عن الفعالية الاستقلابية للبانيات العظمية والناقضات العظمية على الترتيب، حيث أنه في معظم الظروف تحدث عملية إعادة التشكل remodelling بشكل متزامن بين البناء والارتشاف كما ذكر سابقاً.

- ومن الجدير بالذكر أن واصمات التقلب العظمي (BTMs) لا تتحكم باستقلاب العظام وليست نوعية لأمراض معينة وإنما تعكس حالة الهيكل العظمي بشكل عام، بغض النظر عن المسبب المرضي [64].

2. 4. 1. واصمات التشكل العظمي : Markers of Bone Formation

هي عبارة عن منتجات البانيات العظمية الفعالة. يُعبّر عنها خلال المراحل المختلفة من تطور البانيات العظمية وهي تعكس فعالية عمل البانيات العظمية والتشكل العظمي. ويمكن قياس هذه الواصمات في المصل أو البلازما وهي تتضمن :

2. 4. 1. 1. الفسفاتاز القلوية العظمية النوعية Bone Specific Alkaline Phosphatase (BSAP)

تعد الفسفاتاز القلوية العظمية من الأشكال الإسوية isoforms للفسفاتاز القلوية. والتي هي إنزيم رباعي القسيمات tetrameric مرتبط بالجليكوزيل فسفاتيديل إينوزيتول ويتوضع على السطح الخارجي للخلية. يجري ترميز عائلة الفسفاتاز القلوية بواسطة أربعة مواقع جينية، منها ثلاث مواقع نوعية للنسيج وواحدة غير نوعية للنسيج (كلية، كبد، مشيمة، عظم ونسج أخرى ..) [64].

إن الفسفاتاز القلوية العظمية بروتين سكري ينتج من البانيات العظمية ويثبت على سطح البانيات العظمية، ثم يتحرر إلى الدوران. وهو يقوم بتحفيز حلمهة استرات الفسفات على سطح بانيات العظم ويؤمن بذلك تراكيزاً مرتفعةً من الفسفات اللازم لعملية تمعدن العظم. يعكس BALP تبدلات استقلال البانيات العظمية ولقد أظهرت مستوياته المصلية ارتباطاً مع سرعة تشكل العظم [65].

2. 4. 1. 2. النهايات الأمينية والكربوكسيلية لطليعة الكولاجين نمط -1

Carboxy- and Amino-terminal Propeptides of Type 1 Collagen (PICP, PINP)

تشتق طلائع الببتيدات هذه من الكولاجين نمط-1، وهو نمط الكولاجين الأكثر توافراً في العظام، حيث يتم شطره بواسطة بروتيناز متخصص خارج خلوي بعد اصطناعه من قبل البانيات العظمية، وبما أن هذه المكونات (PICP, PINP) تنتج من الكولاجين المصنع حديثاً لذلك تعد مقياساً كمياً للتطور الكولاجيني وبالتالي لتكون العظام.

تم تطوير العديد من الطرق المناعية لمقايسة PICP و PINP. ويتمتع PINP بمصدوقية تشخيصية أعلى من PINP بسبب الثبات الحراري الأفضل [64].

2. 4. 1. 3. الأوستيوكالسين Osteocalcin

2. 4. 1. 3. 1. بنية الأوستيوكالسين The Structure of Osteocalcin

يعد الأوستيوكالسين OC من أهم بروتينات المطرس وهو بروتين المطرس الوحيد الذي يصنع حصراً في العظام من قبل بانينات العظم والأرومات السنية والخلايا الغضروفية الضخمة. يعادل وزنه 5.8 KDa، ويتألف من 49 حمضاً أمينياً لها التسلسل التالي:

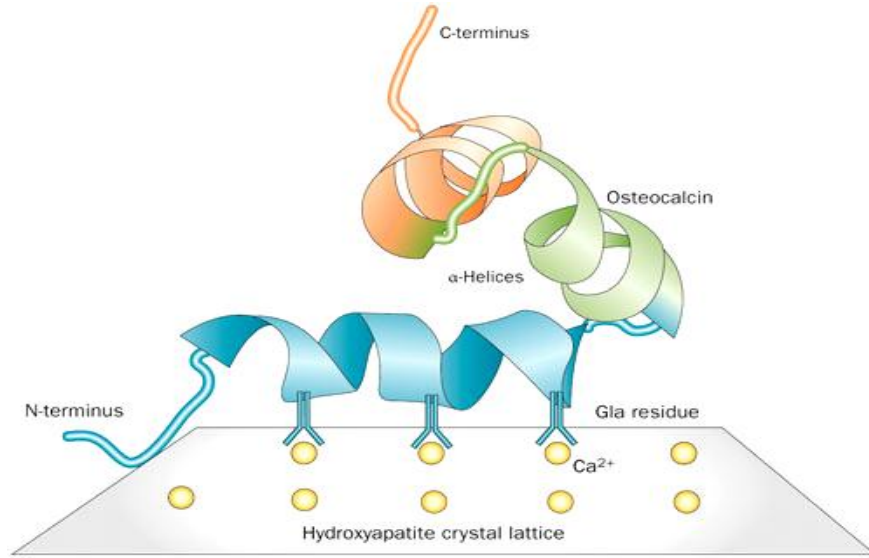
Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro
Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla Leu Asn Pro Asp Cys Asp
Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe
Tyr Gly Pro Val.

يرتبط بالهيدروكسي أباتيت ويتميز بوجود ثلاث ثمالات gamma-carboxyglutamic acid (Gla) [66].

ولقد أظهرت الدراسات وجود بنية ثلاثية الأبعاد تتضمن ثلاث مناطق حلزونية، نهاية مطرافية كربونية كارهة للماء و نهاية أمينية لا بنيوية (الشكل 11). وإن ثمالات Gla جميعها موجودة في البنية الحلزونية وتتداخل مع الكالسيوم ضمن شبكية (HAP) Hydroxyapatite.

تمتد النهاية المطرافية الكربونية خارج الجزيئة وتكون قابلة للتفاعل مع الخلايا المجاورة كما أنها تتأثر بإنزيمات البروتيناز داخلية المنشأ [67].

بينت العديد من الدراسات أن وظيفة OC تعتمد على بنيته وأنه يؤثر على نمو ونضج الطور المعدني. وقد لوحظ تثبيط نمو بلورة HAP إذا كان تركيز OC قليلاً جداً [68].



الشكل 11: بنية الأوستيوكالسين [69].

كما يتدخل عبر بنيته وبواسطة ببتيدات النهاية الكربونية كعامل جذب كيميائي لطليعة ناقضات العظم، مما يدعم دوره في عملية إعادة الصياغة العظمية [70]. كما أظهرت دراسات أخرى أن تركيز OC في العظُمونات (osteons) (الوحدة الرئيسية في البنية العظمية) يتبدل بحسب العمر والجنس وأن تركيز OC في منطقة من العظم القشري ينخفض بانخفاض إعادة الصياغة العظمية في هذه المنطقة [71].

2. 4. 1. 2. الأوستيوكالسين الجائل Circulating Osteocalcin

أظهرت الدراسات التي أجريت على المقاييس الشكلية النسيجية ودراسات حرائك الكالسيوم أن الأوستيوكالسين المصلي يرتبط بمعدل التشكل العظمي وبعده بانبات العظم. وهو يستخدم كواصم للتشكل العظمي [72]. ولقد دعمت الدراسات التي أجريت على الجرذان هذه النتيجة، حيث أنها أظهرت أن الأوستيوكالسين الجائل في الجسم ينتج من اصطناع العظم الجديد وليس من نقض العظم [73].

تأتي الكمية الرئيسية من الأوستيوكالسين الجائل في الجسم من الاصطناع العظمي بواسطة البانيات، كما تشتق منه شذفاً صغيرة بفعل الإنزيمات الحالة (كالكاتيبسين ك والحالات البروتينية المعدنية) أثناء الارتشاف العظمي [74]. وتجري تصفية هذه الشذف بسرعة عبر الكلية.

إن المقاييس التجارية المتواجدة كمقاييسه الممتمز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) التي تعمل في موقعين 2-sites لا تتحرى الشدف الصغيرة وبالنتيجة فإن هذه المقاييسه تعبر عن التشكل العظمي. وإن بعض مقاييسه الأضداد وحيدة النسيلة لا تستطيع كشف هذه الشدف في المصل وإنما تكشفها في البول وهنا تعبر عن الارتشاف العظمي، لذلك فإنه من الضروري الفهم الجيد لنوعية المقاييسه لمنع الحصول على نتائج متداخلة [75].

2. 4. 1. 3. 3. N-MID Osteocalcin

يُضمّن الجزء الكبير من بروتين الأوستيوكالسين المصنع حديثاً في الحيز الخارج خلوي من المطرس العظمي، وذلك بعد تحرره مباشرةً من بانيات العظم. وهو يشكل ما يقارب 15% من البروتينات اللاكولاجينية في العظم. ويجري تحرر جزء أصغر من الأوستيوكالسين إلى الدوران ويمكن تحريره بالطرق المناعية [76].

أظهرت المقاييسه الشكلائية النسيجية histomorphometry أن المستويات المصلية للأوستيوكالسين ترتبط بشكل كبير مع معدل التشكل العظمي [77].

ومن الجدير بالذكر أن البيبتيد يتعرض سريعاً للتدرك في المصل، ولذلك فإننا نجد الشدف ونجد أيضاً كامل البيبتيد في الدوران. وبما أن OC يتداخل ضمن المطرس العظمي فقد اقترحت بعض الدراسات أنه بالإمكان إيجاد شدف من الأوستيوكالسين تم تحريرها أثناء الارتشاف العظمي. تعد هذه الاقتراحات صحيحة في حالة الشدف الصغيرة من جهة النهاية المطرافية الأمانة والتي تتواجد عند الأفراد ذوي معدل التقلب العالي [78].

تتوافر مقاييسه مناعية ثنائية الموضع Two-site immunoassays تستخدم الأضداد وتتحري جزيئة الأوستيوكالسين السليمة intact OC 1-49. فقط ثلث الأوستيوكالسين الكلي total OC في المصل هو عبارة عن intact OC. وبسبب عدم ثباتية OC في المصل فإننا نلاحظ انخفاضاً سريعاً في الفعالية المناعية لهذه المقاييسه عندما تترك العينات ساعة واحدة في حرارة الغرفة. ولحل هذه المشكله جرى تطوير مقاييسه جديدة تقيس أكبر ناتج لتدرك الأوستيوكالسين وهو N-terminal/mid-molecule 1-43، ولقد استخدمنا هذه المقاييسه للتعبير عن الاوستيوكالسين في دراستنا. هذه الشدفه تشكل ثلث الأوستيوكالسين الجائل وذلك لأنها تنتج من التدرك الحال للبروتين التي تخضع له جزيئة intact OC والتي يجري تحررها من بانيات العظم الفعالة [79].

2. 4. 1. 3. 4. الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة : (ucOC) undercarboxylated osteocalcin

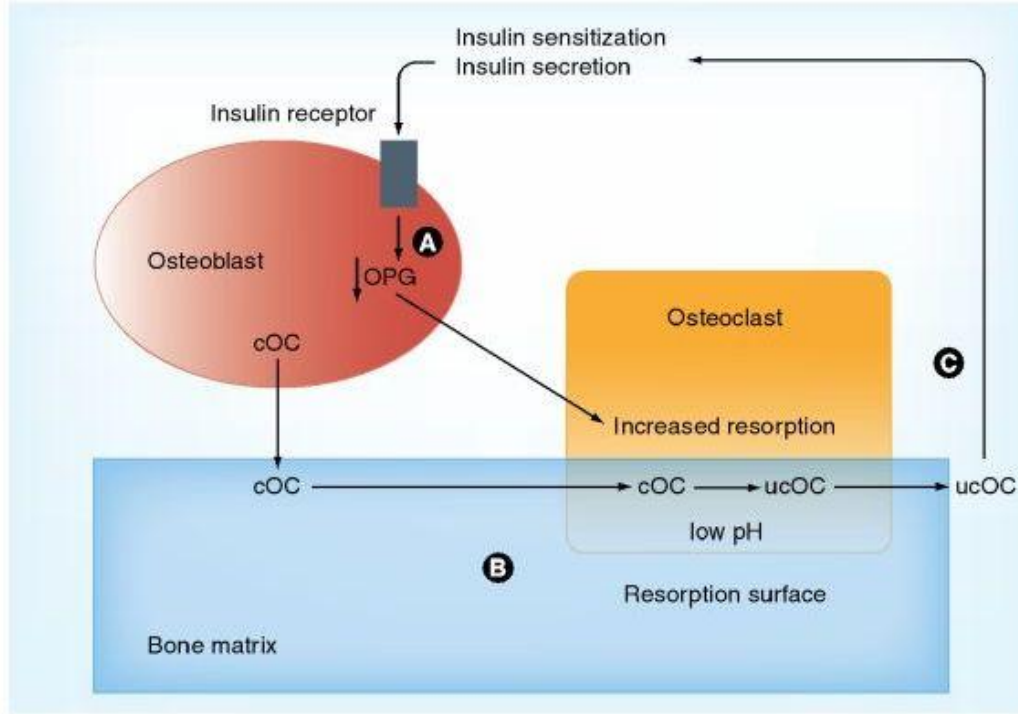
يعد فيتامين ك عاملاً مساعداً للكرسلة في العملية التالية للترجمة للعديد من البروتينات ومنها الأوستيوكالسين. يتم تنظيم الاصطناع الحيوي للأوستيوكالسين عبر الهرمونات وعوامل النمو وليس عن طريق فيتامين ك الذي يتحكم فقط بدرجة كرسلة جزيئة الأوستيوكالسين [80].

لدى معظم أنماط الأحياء تكون سلاسل Gla الثلاث مكرسلة ولكن الأوستيوكالسين في مصل وعظام الإنسان يكون غير كامل الكرسلة، وهذا الاختلاف في درجة الكرسلة يتبع التبدلات في مدخول فيتامين ك. ولذلك يعد تقييم ucOC الجائل مقياساً حساساً لنفاذ وتعويض ووارد فيتامين ك في الجسم [81].

2. 4. 1. 3. 5. وظائف الأوستيوكالسين الهرمونية Hormonal functions of Osteocalcin

أظهر Gerard Karsenty مع مجموعة من زملائه أن الفئران التي تحمل جين OC معطل تكون بدينة، لديها تراكيز مرتفعة من الغلوكوز والشحوم، مستويات أنسولين منخفضة ومستوى تحمل غلوكوز منخفض. ولقد جرى الاستنتاج أن إشارة الإنسولين في بانيات العظم تنظم استقلاب الغلوكوز عبر سبيل ucOC، وأن إشارة الإنسولين في بانيات العظم تميل نحو تحفيز الارتشاف العظمي، حيث تحدث إزالة جذر كربوكسيل من الأوستيوكالسين ضمن جُوبة الارتشاف resorption lacunae، مما يؤدي إلى زيادة ucOC الجائل الذي يعود ويشكل حلقة ارتجاع إيجابي positive feedback على إفراز الأنسولين [82] (الشكل 12).

ولقد دعمت هذه النتيجة دراسة أظهرت أن حدوث خلل في التعبير عن مستقبل الأنسولين على سطح البانيات العظمية يخفض من مستويات ucOC و total OC وبالتالي عدم تحمل الغلوكوز وانخفاض مستويات الأنسولين عند الفئران [83].



Source: Expert Rev Endocrinol Metab © 2011 Expert Reviews Ltd

الشكل 12: تأثير الأنسولين على بانيات العظم وتنظيم توافر ucOC [84].

A- ارتباطه بمستقبله على بانيات العظم يخفض التعبير عن OPG وهذا يميل لتفعيل الارتشاف في ناقضات العظم.

B- cOC يفرز من بانيات العظم ويخضع لنزع كربوكسيل في جوبة الارتشاف مما يزيد من ucOC.

C- ucOC الجائل يدعم الحساسية للأنسولين ويزيد من إفرازه.

2. 4. 2. واصمات الارتشاف العظمي Markers of Bone Resorption

2. 4. 2. 1. الهيدروكسي برولين hydroxyproline (OHP)

يتشكل الهيدروكسي برولين في الحيز داخل الخلية بعد إضافة جذر هيدروكسيل بعد ترجمة البرولين، ويضم من 12-14% من كامل الأحماض الأمينية المكونة للكولاجين الناضج. يجري استقلاب 90% منها في الكبد وبالتالي يجري التحري عنها في البول. اعتُبر الهيدروكسي برولين البولي كواصم يعكس الارتشاف العظمي، حتى لوحظ أن نسبة مهمة منه تأتي من تدرك الكولاجين المصنع حديثاً، بالإضافة لتواجده في أنسجة أخرى

كالجلد وغيره .. ولذلك اعتُبر مشعراً غير نوعياً لاستقلاب الكولاجين واستبدل بغيره من واصمات الارتشاف الأكثر نوعية.

2. 4. 2. 2. روابط الكولاجين البيريدينولية المتصالبة DPD, PYD

pyridinium crosslink pyridinoline :PYD

pyridinium crosslink deoxypyridinoline :DPD

هي الروابط المتصالبة الرئيسية في الأنسجة الهيكلية وهي تعمل كمثبتات في الكولاجين، تتشكل خلال مرحلة نضج الكولاجين الليفي.

تنشأ الروابط المتصالبة للبيريدينولين باشتراك ثلاث سلاسل جانبية للهيدروكسي ليزين، بينما تنتج في DPD من اشتراك اثنين من السلاسل الجانبية للهيدروكسي ليزين وسلسلة جانبية من الليزين.

يعد DPD واصمة أكثر نوعية للعظم من PYD لأن DPD نوعي للعظم والعاج بشكل نسبي.

2. 4. 2. 3. الفسفاتاز الحمضية المقاومة للطرطرات (TRAP)

tartrate-resistant acid phosphatase

هو عبارة عن أنزيم مقاوم للتثبيط بالطرطرات، ينتمي إلى عائلة كبيرة من الأشكال الإسوية، ويتم تصنيعه من الناقضات أثناء الارتشاف العظمي [64].

2. 4. 2. 4. بيتيدات الكولاجين الانتهائية Crosslinked Telopeptides of Type I

Collagen

تعتمد معظم المقاييسات الموجودة لتقييم الارتشاف العظمي على تحري شدف الكولاجين نمط 1 في البول أو في المصل.

تقوم ناقضات العظم بالارتشاف العظمي ويحدث بالنتيجة تدرك للكولاجين بواسطة cathepsin K وينتج لدينا بيتيدات انتهائية قد تحوي الروابط المتصالبة، وبحسب موقع شطر الببتيد الانتهائي (النهاية الكربوكسيلية او النهاية الأمينية) من جزيئة الكولاجين ينتج

لدينا CTX (carboxy terminal telopeptide of type 1 collagen) ، NTX (amino terminal telopeptide of type 1 collagen). ويمكن أن تخضع هذه الجزيئات إلى تدرك لاحق فتححر PYD,DPD وغيرها من الروابط المتصالبة الحرة وفي حالات معينة يمكن أن يتشكل ICTP (type 1 collagen crosslinked) (telopeptide) [85].

ويعد قياس ICTP مفيداً وبشكل خاص لتقييم حدوث ارتشاف عظمي مرضي في حالات النقائل العظمية أو التهاب المفاصل الروماتويدي. بينما الواصمات الناتجة عن فعل الكاتبسين ك في العظم (NTX , CTX) هي أكثر حساسية في حالات تخلخل العظام التالي للإياس [86].

4.2.4.1. الببتيد الانتهائي المتصالب في الكولاجين نمط 1- (ICTP)

هو منطقة الببتيد الانتهائي للنهاية الكربوكسيلية للكولاجين نمط 1 مربوط بواسطة اربعة اربطة متصالبة crosslinks تتحرر خلال تدرك الكولاجين نمط 1 الناضج. ويوجد هذا الببتيد بشكله الناضج في الدم بعد اشتقاقه من ارتشاف العظم وتدرج النسج الضامة الرخوة. ينتج مستضد ICTP من فعل الميتالوبروتينات المطرسية matrix metalloproteinases وبالتالي فإن ارتفاع مستوياته المصلية تشاهد في حالات الانحلال العظمي وبما أن هذه الميتالوبروتينات لا تتأثر بالتبدلات الهرمونية فإن ICTP لا يتأثر بالإياس [87].

4.2.4.2. النهاية الأمينية للببتيد الانتهائي في الكولاجين نمط 1 (NTX):

يربط الرابط البيريدينوليوني في منطقة NTX عديدات الببتيد 1α للكولاجين نمط 1 مع عديدات الببتيد 2α للكولاجين نمط 1، بينما يقوم الرابط المتصالب في الأنسجة الأخرى بربط عديدات الببتيد 1α مع عديدات الببتيد 1α وهذا ما يجعل NTX نوعياً بشكل نسبي للعظام. وتعكس مستوياته المصلية أو البولوية معدل ارتشاف العظام. ولقد لوحظت مستويات مرتفعة منه لدى النساء بعد سن الإياس [88].

4.2. 2. 4. 3. النهاية الكربوكسيلية للبيتيد الانتهائي في الكولاجين نمط 1 (CTX-1)

تتكون جزيئة الكولاجين نمط 1 من انضمام سلسلة 1 α وسلسلة 2 α بشكل حلزوني ثلاثي (ما عدا النهايتين N و C). تخضع هذه الجزيئة ضمن المطرس العظمي إلى مجموعة من تعديلات ما بعد الترجمة (تعديلات إنزيمية وغير إنزيمية داخل وخارج الخلية).

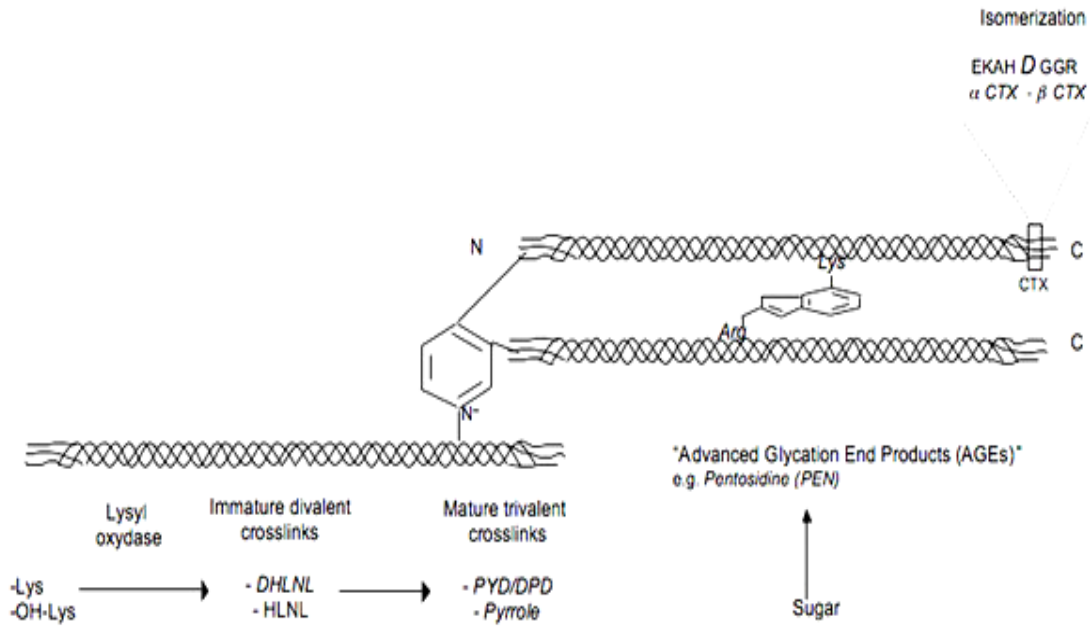
تبدأ هذه التفاعلات بانقلاب ثمالات الليزين والهيدروكسي ليزين (بفعل إنزيم lysyl immature divalent oxidase)، وينتج لدينا جزيئات ثنائية التكافؤ غير ناضجة crosslinking molecules (dihydroxylysinoxorleucine, DHLNL and hydroxylysinoxorleucine, HLNL)، ثم يتشكل جسر يربط بين نهايتين مطرافيتين لسلسلتين ومنطقة حلزونية لسلسلة أخرى فنحصل على جزيئات ثلاثية التكافؤ ناضجة mature trivalent crosslinks. العملية التالية هي عملية إضافة سكر Advanced Glycation End products (AGEs) (النواتج النهائية للغلطة المتقدمة) وهي عملية غير إنزيمية تتم تلقائياً بمجرد وجود سكر مناسب، ثم تحدث عملية مصاوغه على النهاية الكربوكسيلية للسلسلة $\alpha 1$ في الموقع 19 على حمض الأسبارتيك بالموقع α وتتحول الجزيئة إلى المصاوغه β (β -CTX)، وإن هذا التعديل هو تعديل غير إنزيمي من تعديلات ما بعد الترجمة يترافق مع تقدم عمر البروتين (الشكل 13). وإن هذه العملية تؤدي إلى تغيير في هيئة النهاية المطرافية الكربوكسيلية وتأخذ شكل لوية في هيكل البيتيد [89].

- لوحظ أن لهذه التعديلات التي تحصل في بنية الكولاجين نمط 1 علاقة في انخفاض قوة العظم المترافقة مع التخلخل العظمي [90].

تتألف النهاية الكربوكسيلية للبيتيد الانتهائي للكولاجين نمط 1 من 26 حمضاً أمينياً وتتضمن تسلسلاً بيتيدياً ثمانية octapeptide هو EKAHDGGR. يمتلك هذا البيتيد أهمية خاصة لأنه يمثل المحدد المستضدي epitope المعايير في جميع أنواع المقاييس المناعية للنهاية الكربوكسيلية للبيتيد الانتهائي من الكولاجين نمط 1.

أشارت العديد من الدراسات إلى تأثير الإياس على مستويات CTX-1، حيث يزداد معدل فقد العظم بعد الإياس بسبب خلل التوازن في قلب العظم وزيادة ارتشاف العظم كما ذكرنا

سابقاً. وبما أن CTX-1 ينتج من فعل الكاتبسين k في الكولاجين نمط 1 وهذا الإنزيم يتأثر بالتغيرات الهرمونية التي تحدث بعد سن الإياس، حيث يحدث انخفاض مستويات الاستروجين مما يؤدي إلى زيادة مفاجئة في السيتوكينات وبالتالي زيادة معدل الارتشاف وزيادة مستويات CTX-1 المصلية [91].



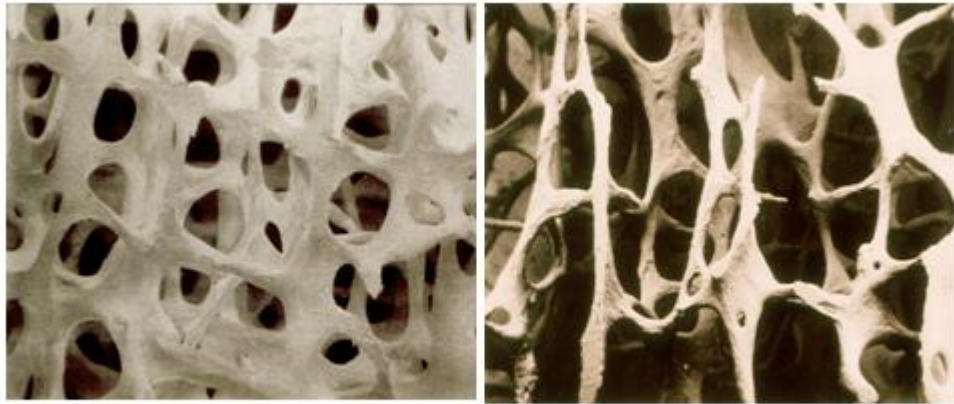
الشكل 13: تعديلات الكولاجين نمط 1 [5].

3. تخلل العظم

1.3. مقدمة عامة

يدل مصطلح تخلل العظم الأولي على نقصان الكتلة العظمية والكسور لدى النساء ما بعد الإياس (التخلل العظمي التالي للإياس) ويدعى لدى النساء والرجال في سن الشيخوخة (تخلل العظم الشيخوخي). أما تخلل العظم الثانوي فهو فقد عظمي ناتج عن اضطرابات سريرية نوعية مثل التسمم الدرقي أو فرط إفراز هرمونات قشر الكظر... أما حالات الفقد المعتمد على الاستروجين مثل انقطاع الحيض أو الأورام المفرزة للبرولاكتين فتعالج كحالات خاصة من تخلل العظم الأولي.

إن الميزة المعهودة في العظام ناقصة الكثافة هي نقص حجم العظم الاسفنجي reduction in cancellous bone volume (اضطراب كمي) من جهة (الشكل 14)، وتأذي البنية المجهرية للنسيج العظمي microarchitectural (اضطراب نوعي) من جهة أخرى [92].



Healthy bone

Osteoporotic bone

الشكل 14: مقارنة بين عظام ناقصة الكثافة العظمية وعظام سليمة [93].

2.3. التوزيع الديموغرافي لمرضى تخلل العظم Demographics of Osteoporosis

في العالم: - 1 من 3 نساء و 1 من 5 رجال بعمر < 50 عاماً سيتطور لديهم كسور متعلقة بتخلل العظام .

- 30-50% من النساء و15-30% من الرجال سيتعرضون لكسور متعلقة بتخلخل العظام خلال فترة حياتهم .

- 75 مليون شخص في الولايات المتحدة وأوروبا واليابان مصابون بتخلخل العظام.

في الولايات المتحدة : - في عام 2010 : كان 12 مليون شخص بعمر <50 عاماً يعانون من تخلخل العظام و 40 مليون شخص لديهم كتلة عظمية منخفضة.

- بحلول عام 2020: سيعاني 14 مليون شخص بعمر <50 عاماً من تخلخل العظام و47 مليون شخص سيكون لديهم كتلة عظمية منخفضة.

بحلول عام 2040 : ستزداد الكسور الوركية من 2-3 أضعاف [94-95].

3.3. تشخيص تخلخل العظم Osteoporosis Diagnosis

3.3.1. الوسائل الاستقصائية في التخلخل العظمي

إن تشخيص تخلخل العظم يعد تحدٍ للكثير من الشعاعيين والعاملين في مجال الوبائيات والسريريين، بالإضافة إلى الباحثين، وغيرهم ممن تربطهم علاقة بهذه الآفة [96].

ولقد تنوعت التقنيات التي يمكن من خلالها الكشف عن هذا المرض الصامت من حيث مدى بساطة التقنية أو تعقيدها والتكلفة وسرعة إعطاء النتائج ودقتها، ويمكن تقسيم الأدوات التشخيصية إلى تلك المعتمدة على التصوير الطبي وغير المعتمدة عليه.

3.3.1.1. تقنيات تشخيص تخلخل العظم غير المعتمدة على التصوير الطبي

3.3.1.1.1. FRAX (Fracture risk assessment tool) أداة منظمة

الصحة العالمية (WHO) لتعيين اختطار الكسر

هي عبارة عن برنامج حاسوبي يقوم بتحديد احتمالية الإصابة بكسر عظمي على مدى الأعوام العشر القادمة اعتماداً على عوامل الخطورة السريرية التي يتم ادخالها إلى البرنامج [97].

3.3.1.1.2. التقنيات المخبرية

ليس هنالك اختبار مخبري لتخلخل العظم بحد ذاته. وهذا ما دفعنا للتفكير بإيجاد تحليل دموي يعبر عن الحالة العظمية كون إجراء التحاليل الدموية يعد روتينياً في كثير من الأحيان بعد عمر معين. ومن الجدير بالأهمية التحري عن بعض الاسباب الثانوية أو عوز فيتامين د، تحليل الكالسيوم وهرمون جارات الدرق [98].

3.3.1.1.3. التحليل النسيجي الشكليائي Histomorphometry

يعرف أيضاً بعلم النسيج الكمي quantitative histology ويعتمد على عد مكونات النسيج العظمي كالأخلاق والمكونات خارج الخلية والبنية الدقيقة للعظام. وهي الطريقة الوحيدة التي تقدر التمعدن العظمي والتكون على المستوى الخلوي ومستوى وحدة إعادة التشكل والمستوى النسيجي [99].

يجرى الاختبار على خزعة من الحرقفة تعالج وتدرس بالتألق الضوئي من أجل دراسة ديناميكية التشكل.

3.3.1.1.4. قياس خصائص العظم الميكانيكية الدقيقة Bone micromechanical properties measurments

هذا القياس مطلوب لتعيين خطر الانكسار وتقييم المعالجات والتنبؤ بنجاح الزرع العظمي وتعيين تأثيرات اضطرابات إعادة التشكل العظمي. ويوجد طريقتان حديثتان لقياسها وهما: 1- التباعد النانومتري nano-indentation و 2- اختبار اللي ثلاثي النقاط three point pending test [100].

3.3.1.1.5. طريقة العناصر المنتهية (FEM) Finite element method

هي تقنية حاسوبية متقدمة لتقييم الجهود العظمية البنوية، تدرس ميكانيكية العظم البشري. تم تطويرها واستخدامها لتعيين المقاومة في الفقرات الظهرية وللتنبؤ باختطار الكسر في عنق الفخذ [101].

3. 3. 1. 2. التقنيات التشخيصية المعتمدة على التصوير الطبي Medical imaging systems for diagnosis

يمكن تقسيم هذه التقنيات إلى تلك المعتمدة على الأشعة السينية وتقنيات التصوير بالأشعة فوق الصوتية وتقنيات التصوير بالرنين المغناطيسي. وتختلف بحسب الصور الناتجة، فمنها ما تعطي صور ثلاثية الأبعاد ومنها تعطي صور ثنائية الأبعاد. كما يمكن تقسيمها بحسب التحري عن البنية العظمية فمنها ما تسمح بالحصول على البنية العظمية الدقيقة على المستوى الميكروني مثل التصوير المقطعي المحوسب عالي الدقة (High definition computed tomography)، التصوير المقطعي المحوسب الميكروني (microslides computed tomography)، التصوير بالرنين المغناطيسي عالي الدقة (High definition magnetic resonance imaging) والرنين المغناطيسي الميكروني ومنها ما تتحرى عن البنية العظمية على المستوى الأكبر (الميليمتر) مثل جهاز قياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة و التصوير المقطعي المحوسب الكمي (QCT) Quantitative computed tomography^[102]. ينصح البعض باستخدام تقنيتي التصوير المقطعي المحوسب والتصوير بالرنين المغناطيسي معاً من أجل الحصول على نتيجة ذات مصداقية أكبر^[103].

- التصوير بجهاز مقياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة Dual x-ray absorptiometry (DXA)

يعد المقياس الذهبي لقياس الكثافة المعدنية العظمية Bone Mineral Density (BMD)، يتم تطبيقه على الفقرات والورك ويمكن تطبيقه على الأطراف^[104].

- يجري التعبير عن الكثافة العظمية عبر مقياسين :

مقياس T: T-score وهو عدد الانحرافات المعيارية عن قيم الكثافة العظمية لبالغ young adult من الجنس والعرق نفسه (قيمة الكتلة العظمية). وهو يحدد مدى القابلية للإصابة بالكسور ويعتمد عليه لتحديد درجة تخلخل العظم (الجدول 1).

الجدول (1): درجة تخلخل العظم اعتماداً على مقياس T

T-score	الكثافة العظمية
T-SCORE \geq -1	كثافة عظمية طبيعية
-1 < T-score < -2.5	حالة قلة عظم وهي حالة تكون فيها الكثافة العظمية أقل من الطبيعي ويمكن أن تترقى إلى تخلخل عظمي
T-score \leq -2.5	حالة تخلخل عظمي

وبسبب أن الكتلة العظمية لا تستقر إلا بعد عمر معين تصبح القياسات المأخوذة قبل سن البلوغ دائماً أقل من الحد الطبيعي ولذلك جرى وضع المقياس الثاني (مقياس Z).

- مقياس Z: Z-score وهو عدد الانحرافات المعيارية عن قيم الكثافة لشخص من العمر والجنس والعرق والوزن نفسه. وإذا كان مقياس Z مساوياً القيمة -2 أو أقل فهذا يعني وجود عامل آخر غير العمر يؤدي إلى فقدان الكتلة العظمية [105].

- قد لا تكون قيمة BMD معبرة عن الوضع الحقيقي بسبب التهاب المفاصل واعتلال المفاصل السطحي في الفقرات أو بسبب التبدلات المفصالية في الورك [106].

يعد BMD المحدد الأساسي للمقاومة العظمية مع أننا لا نستطيع التمييز بين مريض معرض لاختطار الكسر وآخر غير معرض باستخدامه لوحده (بسبب وجود نتائج سلبية وإيجابية كاذبة كثيرة) [107].

ومن مأخذ هذه التقنية أيضاً أنها لا تميز بين العظم الحويجزى والعظم القشري، حيث أن الأول أكثر تأثراً بالاستقلاب من نظيره القشري [108]. كما أنها لا تعطي قياسات بنيوية والتي وجدت الدراسات أنها تحسن بشدة من التمييز بين المصابين بالتخلخل العظمي وغير المصابين به [106].

3.3.2. القصور في تشخيص تخلخل العظم Underdiagnosis of osteoporosis

من الواضح أن التخلخل العظمي يعاني من قصور في تشخيصه في المجتمع الطبي. حيث أن تشخيصه وتدبيره لا يجرى إلا لقسم صغير من المرضى الذين تعرضوا لحوادث كسور، على الرغم من أن قصة سابقة لحدوث كسر هي عامل اختطار مرتفع لحدوث كسر مستقبلي، ولقد أشارت لذلك العديد من الدراسات، فبلغت النسبة في إحدى الدراسات 6% فقط من هؤلاء المرضى.

يركز جراحي العظام وأطباء الرعاية، عند حدوث كسور هشاشة، على المشكلة الصارخة (الكسر الحاصل) على حساب المرض الخفي (تخلخل العظم). وهذا ما جعل القصور في تشخيص تخلخل العظم بعد كسور الهشاشة ظاهرة عالمية.

ولقد أشارت دراسة أخرى إلى عدم تصوير مرضى كسور الورك بال DXA أثناء تواجدهم في المستشفى، حيث جرى تسجيل التخلخل العظمي في ملف 26% فقط من المرضى الذين تعرضوا لكسور وركبية. أظهرت دراسة مراجعة أن من وصف لهم جرعات كافية من الكالسيوم وفيتامين د لم تتعد نسبتهم 8%. وقد صرح 6% فقط من جراحي العظام و 1% فقط من الممارسين العاميين في استبيان وزع عليهم في إحدى الدراسات أنهم سيقومون بتحويل كسور الورك إلى العيادات العظمية. ويجدر الذكر أن البعض يدعو إلى أخذ تخلخل العظم بالحسبان حتى في حالات الكسور الناتجة عن الرضوض الشديدة [106].

وبما أن هؤلاء المرضى جميعهم يخضعون لتحاليل طبية ضمن المستشفيات فلم لا نضيف تحليلاً طبياً بسيطاً يقوم بكشف تخلخل العظم مما يساعد على التشخيص والمعالجة ضمن فترة التواجد في المستشفى وحتى بعد خروج المرضى منها.

4. هدف البحث

يهدف هذا البحث إلى تقييم دور بروتين DKK-1 في التنبؤ بالكثافة العظمية لدى نساء بعد سن الإياس، وبالتالي إمكانية الاستعاضة عن التصوير بالأشعة السينية (جهاز مقياس الكثافة العظمية) لتشخيص تخلخل العظم باستخدام تحليل دموي لهذا البروتين.

ونظراً لأن تقييم معدل التقلب العظمي يعتمد على قياس واصمات البناء والارتشاف العظمي، فكان هدف هذا البحث أيضاً ربط مستويات بروتين DKK-1 بمعدل التبدلات العظمية الحاصلة من خلال مقارنة مستوياته المصلية مع المستويات المصلية لواصم من واصمات البناء العظمي وهو الأوستيوكالسين، والمستويات المصلية لواصم الارتشاف العظمي CTX-1 وذلك لكشف التبدل الذي يؤدي إلى نقص في الكثافة العظمية وبالتالي زيادة معدل الكسور.

وبالتالي تقييم ما إذا كان بإمكاننا أن نحصل على واصم سهل القياس مخبرياً و يعبر عن الكثافة المعدنية العظمية ترتبط مستوياته بمعدل التبدلات العظمية الحاصلة، مما يتيح الوقاية من التعرض للأشعة بمقاييس سهلة التطبيق قليلة الكلفة وتغني عن قياس عدة واصمات للتعبير عن معدل التقلب العظمي.

|| القسم العملي

1- المواد والطرق

1.1. أفراد الدراسة Study subjects

شملت الدراسة 84 مريضةً تراوحت أعمارهنّ بين 43 و87 عاماً، ولقد جرى انتقاء أفراد الدراسة تبعاً للشروط التالية:

- شروط الاشتمال: امرأة بعد سن اليأس غير مدخنة وغير كحولية.
- شروط الاستبعاد: استخدام أية أدوية لتخلخل العظام، وجود أمراض قلبية أو كلوية أو سكري أو أمراض مناعة ذاتية وكذلك تم استبعاد العينات المنحلة.
- استبعدت نتائج 7 مريضات بسبب عدم تحقيقهن لشروط الدراسة، فأصبحت عينة البحث مؤلفةً من 77 مريضةً تراوحت أعمارهنّ بين 43 و87 عاماً.
- ولقد كان توزيع المريضات في عينة البحث وفقاً للعمر وقيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة البدانة كما يلي:

1 - بلغ المتوسط الحسابي لأعمار المريضات \pm الانحراف المعياري: 8.7 ± 60.1 عاماً وبلغ متوسط منسب كتلة الجسم BMI 29.69 ± 3.81 كغ/م² (الجدول 1).

الجدول 1: يبين الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لأعمار المريضات (بالأعوام) وقيم منسب كتلة الجسم BMI في عينة البحث.

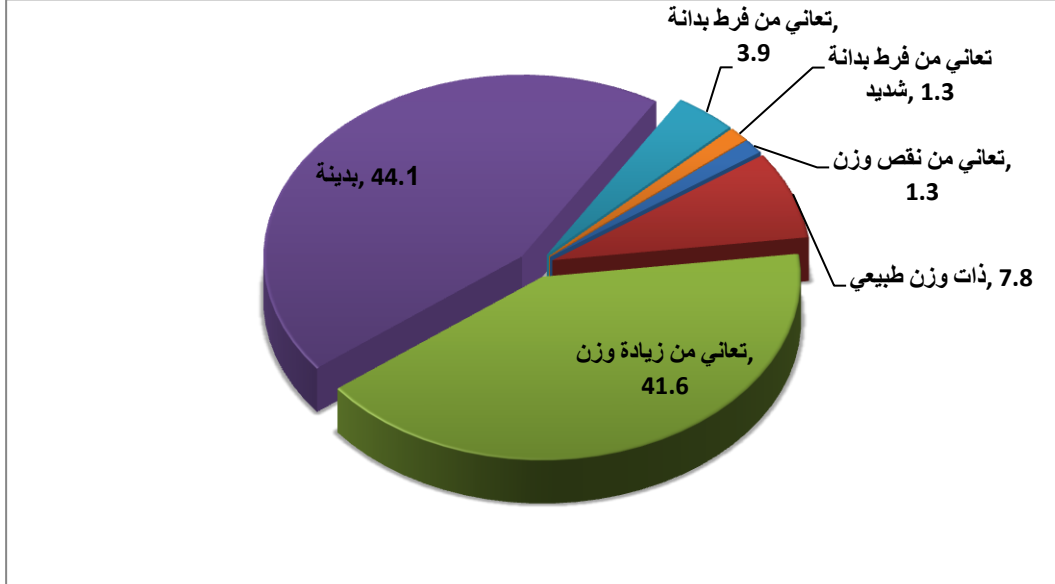
المتغير المدروس	عدد المريضات	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
عمر المريضة (بالأعوام)	77	43	87	60.1	8.7
مشعر كتلة الجسم BMI (كغ/م ²)	77	18.14	41.16	29.69	3.81

2 - جرى توزيع النساء المشاركات في عينة البحث تبعاً لدرجة البدانة كما هو مبين بالجدول 2.

جدول 2: توزع المريضات في عينة البحث تبعاً لوزن الجسم.

درجة البدانة	عدد المريضات	النسبة المئوية %
تعاني من نقص وزن	1	1.3
ذات وزن طبيعي	6	7.8
تعاني من زيادة وزن	32	41.6
بدينة	34	44.1
تعاني من فرط بدانة	3	3.9
تعاني من فرط بدانة شديد	1	1.3
المجموع	77	100

كما يمثل الشكل 1 توزعاً تخطيطياً للنسب المئوية للمريضات اعتماداً على مقياس البدانة.



الشكل 1: النسبة المئوية لتوزع المريضات في عينة البحث تبعاً لدرجة البدانة.

واستخدمت الاستمارة التالية (الشكل 2) للحصول على المعلومات لكل فرد من أفراد الدراسة.

وزارة التعليم العالي

جامعة دمشق - كلية الصيدلة

دراسة ارتباط DKK1 مع كثافة العظم المعدنية وواصفات تقلب العظم لدى النساء بعد الإياس
Study of DKK1 correlation with bone mineral density and bone turnover rate markers in postmenopausal women

إعداد الصيدلانية: أمل واكيم

إشراف: أ.د. فايزة القبيلي

اسم المريضة العمر

الوزن الطول BMI

العنوان رقم الهاتف

التدخين : نعم لا الكحول : نعم لا

- هل تعانيين من مرض عام (سكري، ضغط، أمراض كلوية، سوء امتصاص، اضطرابات بالغدة الدرقية، التهاب مفاصل) يرجى ذكرها:

.....

- هل تتناولين أي نوع من الأدوية؟؟ إذا كان الجواب نعم، يرجى ذكرها:

.....

- ما هو سبب إجراء صورة الكثافة العظمية؟؟ اختاري مما يلي :

طبيب العظمية طلب الصورة

أنا أقوم بها بشكل دوري

آلام عظمية في مناطق مختلفة من الجسم

أسباب أخرى يرجى ذكرها

- تاريخ إجراء صورة الكثافة والصورة السابقة في حال وجودها:

.....

- موافقة المشاركة بالبحث:

أوافق على المشاركة في هذا البحث بعد أن تم تقديم لمحة موجزة عنه والإجابة على جميع تساؤلاتي الخاصة به.

الاسم التوقيع

الشكل 2: استمارة البحث المستخدمة للحصول على بيانات كل فرد من أفراد الدراسة.

2.1. الاعتيان Sampling

جُمعت العينات في الفترة ما بين الشهر التاسع 2012 والشهر التاسع 2013 من مراجعات عيادة تصوير الأشعة في العيادات الشاملة بمستشفى المواساة الجامعي. بعد إجراء صورة الكثافة العظمية جرى بزل دم وريدي (5 مل على أنبوب جاف)، ونبذت عينات الدم بعد سحبها مباشرة بسرعة 3000 gx لمدة 20 دقيقة، ثم وُزِع المصل الناتج من كل عينة على ستة أنابيب ايبندورف، 400-500 مكل في كل أنبوب باستخدام ممص مكروي Micropipete، حُفظت العينات بالتجميد في الدرجة -80 °C إلى حين إجراء المقايسة، خلال ستة أشهر. استخدم كل أنبوب ايبندورف لإجراء مقايسة من المقايسات الثلاث (DKK-1، CTX-1، OC) والأنابيب الباقية بقيت أنابيب احتياطية.

3.1. الطرق Methods

3.1.1. تعيين منسب كتلة الجسم BMI

عُيِّن منسب كتلة الجسم BMI (Body Mass Index) لكل فرد من أفراد الدراسة بتقسيم وزن الجسم مقدراً بالكغ على مربع الطول مقدراً بالمتر.

3.1.2. مقايسة بروتين DKK-1 البشري بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم

جرت المقايسة باستخدام عتيدة Human DKK-1elisa Kit لشركة Sun Red: Biotechnology Company, Shanghai، تسمح هذه العتيدة بالمقايسة الكمية لبروتين DKK-1 في المصل أو البلازما أو سوائل الأنسجة الأخرى بطريقة المقايسة المناعية الإنزيمية (Catalogue NO. 201-12-0631).

- مبدأ الاختبار

تعتمد هذه العتيدة على مبدأ الشطيرة، حيث تتم إضافة العينة الحاوية على DKK-1 البشري إلى آبار العتيدة المغطاة مسبقاً بأضداد DKK-1 وحيدة النسيلة، تحضن العينات ثم يضاف أضداد DKK-1 موسومة بالبيوتين، يجري الحضن مع streptavidin-HRP ليتشكل المعقد المناعي. تحضن العينات ثم تُغسل لإزالة الكميات غير المرتبطة من الإنزيم. ثم يضاف محلول مولد اللون A و B فيتحول لون العينات في الآبار إلى اللون الأزرق، يوقف التفاعل الأنزيمي بإضافة محلول حمضي فيتحول اللون إلى الأصفر، تتناسب شدة اللون

الأصفر الناتج مع تركيز البروتين في العينة.
- يرسم منحنى معياري بتعيين قيم الامتصاص مقابل تراكيز المعياريات وتحدد التراكيز المجهولة للعينات باستخدام هذا المنحنى المعياري.

الكواشف و المواد المرفقة:

محلول معياري 160 نانوغرام/مل 0.5 مل
ممدد معياري 3 مل
مصفوفة مختومة ذات آبار صغيرة (96 بئراً)..... 12 بئر×8 شرائط
محلول الاقتران: ستربتايفيدين- بيروكسيداز فجل الخيل 6 مل
محلول الغسل (يكفي لـ 30 مرة) 20 مل
أضداد DKK-1 موسومة بالبيوتين 1 مل
محلول مولد لون A 6 مل
محلول مولد لون B 6 مل
محلول الإيقاف 6 مل
كتيب تعليمات

أوراق لاصقة لإغلاق سطح المصفوفة عند الحضانة
أكياس قابلة للإغلاق

المواد المطلوبة غير المرفقة بالعنينة:

حاضنة بالدرجة 37 °C

قارئ عتائد نظامي

ممصات دقيقة مع رؤوس ممصات قابلة للاستخدام مرة واحدة

ماء منزوع الشوارد (عقيم)

أوراق ترشيح

أنابيب تستخدم لمرة واحدة

ملاحظات هامة:

- يجب أن تترك العتيدة في حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة بعد إخراجها من الدرجة 2-8 °C لتتوازن درجة حرارتها قبل الاستخدام.
- يجب أن تُحفظ الآبار غير المستخدمة في الأكياس القابلة للإغلاق.
- في كل خطوة يجب إضافة العينات بواسطة حاقتن العينات الذي يعاير بشكل متكرر لتجنب عبء إضافة أي عيب على التجربة.
- تُجرى الخطوات تماماً بحسب الإرشادات المرفقة وتؤخذ النتائج من القارئ النظامي.
- يمنع منعاً باتاً لمس رؤوس الممصات وأوراق الإغلاق بالأيدي منعاً لحدوث التلوث المتصالب.
- يجب عدم تعريض العينات، دائرة الغسل، أو أي نوع من أنواع سوائل الحقن إلى المواد الملوثة.
- يجب حفظ المحاليل المستخدمة بشكل مغلق، وعدم استخدام المحاليل من وِجِيَّة batch أخرى. كما يجب استخدامها قبل انتهاء تاريخ الصلاحية.
- الركازة B حساسة للضوء. يُمنع تعرضها المطول للضوء.

طرق الغسل

- طريقة الغسل اليدوية: قُم بهز المصفوفة لإزالة السوائل الباقية في قعر الآبار، ضع أوراق نشاف على سطح المصفوفة واقلب المصفوفة بقوة. قُم بحقن 0.35 مل من محلول الغسل (بعد تحضيره) في كل بئر وانقع لمدة 1-2 دقيقة. ثم قُم بإعادة العملية بحسب ما هو مطلوب في التعليمات.

- طريقة الغسل الآلية: لا تستخدم آلة الغسل إلا إذا كنت خبيراً بها وبطريقة عملها.

متطلبات العينات:

- استخلص العينة بسرعة قدر المستطاع بعد الجمع، عاير العينات بسرعة بعد الجمع وإذا لم يكن ذلك ممكناً فيجب حفظ العينات بالدرجة - 20. تجنب دورات التجميد المتكرر.
- المصل: يترك المصل ليتخثر في درجة حرارة الغرفة 10-20 دقيقة، ينبذ 20 دقيقة بسرعة 2000-3000 gx، يؤخذ المصل الطافي. يمكن التنبيد مرة أخرى إذا لم يحدث الترسب بشكل جيد.

- ملاحظة: العينات المنحلة بشكل كبير غير مناسبة لهذه المعايير.

إجراءات المقايسة

أ- تمديد المعاريات

هذه العتيدة تُوفر محلولاً معيارياً أصلياً، يمدد حسب التعليمات الواردة.

معياري رقم 5	120مكل معياري أصلي + 120مكل ممدد معياري	80 نغ/ مل
معياري رقم 4	120مكل معياري رقم 5 + 120مكل ممدد معياري	40 نغ/ مل
معياري رقم 3	120مكل معياري رقم 4 + 120مكل ممدد معياري	20 نغ/ مل
معياري رقم 2	120مكل معياري رقم 3 + 120مكل ممدد معياري	10 نغ/ مل
معياري رقم 1	120مكل معياري رقم 2 + 120مكل ممدد معياري	5 نغ/ مل

ب- من المقترح مضاعفة آبار المعاريات وبئر الشاهد، كمية كل عينة يجب أن تكون كافية لمتطلبات المعايرة، مع محاولة الاستفاد قدر المستطاع من مضاعفة الآبار.

ج- إضافة العينات

- بئر الشاهد: لا يضاف أي من: عينات، أصداد DKK-1 الموسومة بالبيوتين، سترينافيدين مرتبط ببيروكسيداز فجل الخيل. إنما يضاف فقط مولد اللون A و B ومحلول الإيقاف. والخطوات الأخرى متشابهة.

- آبار المعاريات: يضاف من المعياري المطلوب 50 مكل، و 50 مكل Str-HRP. (وبما أن المعياري يحوي بيوتين مرتبط بالأصداد فلا حاجة لإضافة أصداد).

- آبار العينات: أضف من العينة المطلوبة 40 مكل، و 10 مكل من أصداد DKK-1، و 50 مكل من Str-HRP، تغلق بأغشية الإغلاق، تحرك بشكل لطيف، تحضن لمدة 60 دقيقة بالدرجة 37 °C.

- لتحضير سائل الغسل مدد 30 مرة بواسطة الماء المقطر.

- عملية الغسل: يُزال الغشاء بحذر، وتهز المصفوفة لإزالة الماء الباقي.

- يضاف من محلول مولد اللون A 50 مكل ثم يضاف من محلول مولد اللون B 50 مكل إلى الآبار جميعها. يُمزج بهدوء. يُحضن لمدة عشر دقائق بالدرجة 37 °C بعيداً عن الضوء

- يضاف محلول الإيقاف 50 مكل لكل الآبار لإيقاف التفاعل (سيلاحظ على الفور تحول اللون من الأزرق إلى الأصفر).



الشكل (3): عتيدة DKK-1 لشركة Sun RED Biotechnology company الصينية.

- عملية القياس النهائية: يعد بئر الشاهد صفر، وتقاس الكثافة الضوئية (OD) optical density في موجة طولها 450 نانو متر. يجب إجراء القياس النهائي خلال 15 دقيقة من إضافة محلول الإيقاف.

- يوضع تركيز المعياريات على الخط الأفقي والكثافة الضوئية OD على الخط العمودي من ورق الرسم المليميترى. يرسم منحنى الخط المعبر عن العلاقة بين التركيز والكثافة. يُعتمد على كثافة العينات المجهولة لحساب تركيزها بإسقاطها على الخط البياني. أو تحسب معادلة التقهقر للخط المستقيم الناتج ويُعتمد عليها لحساب تركيز العينات.

شروط الحفظ: تُحفظ العتيدة غير المفتوحة بالدرجة 2-8°C. يجب إبقاء مصفوفة الآبار ضمن الكيس المغلف لها خلال فترة الحفظ لمنع تعرضها للهواء الرطب. أما العتيدة المفتوحة فتبقى فعالة حتى انتهاء فترة الصلاحية (6 أشهر بالدرجة 2-8°C).

حساسية الطريقة: 0.412 نانو غرام / مل.

مجال المقايسة: 0.5 - 150 نانو غرام / مل.

1.3.3. مقايسة الأوستيوكالسين البشري

جرت المقايسة باستخدام عتيدة Sun Human osteocalcin elisa Kit لشركة Red: Biotechnology Company, Shanghai، تسمح هذه العتيدة بالمقايسة الكمية لبروتين الأوستيوكالسين في المصل أو البلازما أو سوائل الأنسجة الأخرى بطريقة المقايسة المناعية الإنزيمية (Catalogue NO. 202-14-1500).

- مبدأ الاختبار

تعتمد هذه العتيدة على مبدأ الشطيرة، حيث تتم إضافة العينة الحاوية على OC البشري إلى آبار العتيدة المغطاة مسبقاً بأضداد OC وحيدة النسيلة، تحضن العينات ثم يضاف أضداد OC موسومة بالبيوتين، يجري الحضن مع streptavidin-HRP ليتشكل المعقد المناعي. تحضن العينات ثم تُغسل لإزالة كمية الإنزيمات غير المرتبطة. ثم يضاف محلول مولد اللون A و B فيتحول لون العينات في الآبار إلى اللون الأزرق، يوقف التفاعل الإنزيمي بإضافة محلول حمضي فيتحول اللون إلى الأصفر، تتناسب شدة اللون الأصفر الناتج مع تركيز البروتين في العينة.

الكواشف و المواد المرفقة

محلول معياري 144 نانوغرام/مل 0.5 مل

ممدد معياري 3 مل

مصفوفة مختومة ذات آبار صغيرة (96 بئراً) 12 بئر 8x8 شرائط

محلول الاقتران: ستربتافيدين-بيروكسيداز فجل الخيل 6 مل

محلول الغسل (يكفي لـ 30 مرة) 20 مل

أضداد OC موسومة بالبيوتين 1 مل

محلول مولد اللون A (مولد لون) 6 مل

محلول مولد اللون B 6 مل

محلول الإيقاف 6 مل

كتيب تعليمات \

أوراق لاصقة لإغلاق سطح المصفوفة عند الحضن

أكياس بلاستيكية قابلة للإغلاق

المواد المطلوبة غير المرفقة بالعتيدة

حاضنة بالدرجة 37 °C

قارئ عتائد معياري

ممصات دقيقة مع رؤوس ممصات قابلة للاستخدام مرة واحدة

ماء منزوع الشوارد (عقيم)

أوراق ترشيح

أنابيب تستخدم لمرة واحدة

ملاحظات هامة

- يجب أن تترك العتيدة في حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة بعد إخراجها من الدرجة 2-8 °C لتتوازن درجة حرارتها قبل الاستخدام.
- يجب أن تُحفظ الآبار غير المستخدمة في الأكياس القابلة للإغلاق.
- في كل خطوة يجب إضافة العينات بواسطة حاقت العينات الذي يعاير بشكل متكرر لتجنب عبء إضافة أي عيب على التجربة.
- تُجرى الخطوات تماماً بحسب الإرشادات المرفقة وتؤخذ النتائج من القارئ النظامي.
- يمنع منعاً باتاً لمس رؤوس الممصات وأوراق الإغلاق بالأيدي منعاً لحدوث التلوث المتصالب.
- يجب عدم تعريض العينات، دائرة الغسل، أو أي نوع من أنواع سوائل الحقن إلى المواد الملوثة.
- يجب حفظ المحاليل المستخدمة بشكل مغلق، وعدم استخدام المحاليل من وجيبة تحضير إلى أخرى. كما يجب استخدامها قبل انتهاء تاريخ الصلاحية.
- الركازة B حساسة للضوء. يُمنع تعرضها المطول للضوء.

طرق الغسل

- طريقة الغسل اليدوية: قُم بهز المصفوفة لإزالة السوائل الباقية في قعر الآبار، ضع أوراق نشاف على سطح المصفوفة واقلب المصفوفة بقوة. قُم بحقن 0.35 مل من محلول الغسل (بعد تحضيره) في كل بئر واتقع لمدة 1- 2 دقيقة. ثم قُم بإعادة العملية بحسب ما هو مطلوب في التعليمات.

- طريقة الغسل الآلية: لا تستخدم آلة الغسل إلا إذا كنت خبيراً بها وبطريقة عملها.

متطلبات العينات:

- تستخلص العينة بسرعة قدر المستطاع بعد الجمع، تعابر العينات بسرعة بعد الجمع. وإذا لم يكن ذلك ممكناً فيجب حفظ العينات بالدرجة - 20 °C. تجنب دورات التجميد المتكرر.
- المصل: يترك المصل ليتخثر في درجة حرارة الغرفة 10-20 دقيقة، ينبذ 20 دقيقة بسرعة 2000-3000 gx، يؤخذ المصل الطافي. يمكن التنبيد مرة أخرى إذا لم يحدث الترسب بشكل جيد.
- ملاحظة: العينات المنحلة بشكل كبير غير مناسبة لهذه المعايير.

إجراءات المقايسة

أ- تمديد المعاريات

هذه العتيدة تُوفر محلولاً معيارياً أصلياً، يمدد حسب التعليمات الواردة.

معياري رقم 5	120مكل معياري أصلي + 120مكل ممدد معياري	72 نغ/مل
معياري رقم 4	120مكل معياري رقم 5 + 120مكل ممدد معياري	36 نغ/مل
معياري رقم 3	120مكل معياري رقم 4 + 120مكل ممدد معياري	18 نغ/مل
معياري رقم 2	120مكل معياري رقم 3 + 120مكل ممدد معياري	9 نغ/مل
معياري رقم 1	120مكل معياري رقم 2 + 120مكل ممدد معياري	4.5 نغ/مل

ب- من المقترح مضاعفة آبار المعاريات وبنر الشاهد، كمية كل عينة يجب أن تكون كافية لمتطلبات المعايرة، مع محاولة الاستفادة قدر المستطاع من مضاعفة الآبار.

ج- حقن العينات:

- بنر الشاهد: لا يضاف إليها أي من عينات، أضداد OC الموسومة بالبيوتين، سنربنفايدين مرتبط ببيروكسيداز فجل الخيل. فقط أضف مولد اللون A و B ومحلول الإيقاف. الخطوات الأخرى متشابهة.

- آبار المعاريات: يضاف من المعاري المطلوب 50مكل، Str-HRP 50 مكل. (وبما أن المعاري يحوي بيوتين مرتبط بالأضداد فلا حاجة لإضافة أضداد).

- أبار العينات: يضاف من العينة المطلوبة 40 مكل، و 10 مكل من أصداد OC، و 50 مكل Str-HRP، ثم تغلق بأغشية الإغلاق، تحرك بشكل لطيف، تحضن لمدة 60 دقيقة بالدرجة 37 °C.

- لتحضير سائل الغسل يمدد 30 مرة بواسطة الماء المقطر.

- عملية الغسل: يزال الغشاء بحذر، وتهز المصفوفة لإزالة الماء الباقي. (تغسل الصفيحة 5 مرات).

- يضاف 50 مكل من محلول مولد اللون A ثم يضاف 50 مكل من محلول مولد اللون B إلى الأبار جميعها. يمزج بهدوء. يحضن لمدة عشر دقائق بالدرجة 37 °C بعيداً عن الضوء.

- يضاف 50 مكل من محلول الإيقاف لكل الأبار لإيقاف التفاعل (يلاحظ على الفور تحول اللون من الأزرق إلى الأصفر).

- عملية القياس النهائية: يعد بئر الشاهد صفر، ونقيس الكثافة الضوئية (OD) optical density في موجة طولها 450 نانو متر. يجب إجراء القياس النهائي خلال 15 دقيقة من إضافة محلول الإيقاف.

- يوضع تركيز المعياريات على الخط الأفقي والكثافة الضوئية OD على الخط العمودي من ورق الرسم المليمترى. يرسم منحنى الخط المعبر عن العلاقة بين التركيز والكثافة. ويعتمد على كثافة العينات المجهولة لحساب تركيزها بإسقاطها على الخط البياني. أو تحسب معادلة التقهقر للخط المستقيم الناتج ويعتمد عليها لحساب تركيز العينات.

شروط الحفظ: تحفظ العتيدة غير المفتوحة في الدرجة 2-8 °C. ويجب إبقاء مصفوفة الأبار ضمن الكيس المغلف لها خلال فترة الحفظ لمنع تعرضها للهواء الرطب. أما العتيدة المفتوحة فتبقى فعالة حتى انتهاء فترة الصلاحية (6 أشهر بالدرجة 2-8 °C).

حساسية الطريقة: 0.445 نانو غرام / مل.

مجال المقايسة: 0.5 - 120 نانو غرام / مل.

1. 3. 4. مقايضة c-telopeptide of type 1 collagen البشري

أُجريت المقايضة باستخدام عتيدة Human CTX-1 elisa Kit لشركة Sun Red: Biotechnology Compan, Shanghai، حيث تسمح هذه العتيدة بالمقايضة الكمية لـ CTX-1 في المصل أو البلازما أو سوائل الأنسجة الأخرى بطريقة المقايضة المناعية الإنزيمية (Catalogue NO. 201-12-1350).

- مبدأ الاختبار

تعتمد هذه العتيدة على مبدأ الشطيرة، حيث تضاف العينة الحاوية على CTX-1 البشري إلى آبار العتيدة المغطاة مسبقاً بأضداد CTX-1 وحيدة النسيلة، تحضن العينات ثم يضاف أضداد CTX-1 موسومة بالبيوتين، ويجري الحضان مع streptavidin-HRP ليتشكل المعقد المناعي. ثم تُغسل لإزالة كمية الإنزيمات غير المرتبطة. يضاف محلول مولد اللون A و B فيتحول لون العينات في الآبار إلى اللون الأزرق، ثم يوقف التفاعل الإنزيمي بإضافة محلول حمضي فيتحول اللون إلى الأصفر، حيث تتناسب شدة اللون الأصفر الناتج مع تركيز العينة.

الكواشف و المواد المرفقة:

محلول معياري 1600 نانوغرام/ مل 0.5 مل

ممدد معياري 3 مل

مصفوفة مختومة ذات آبار صغيرة (96 بئراً) 12 بئر 8x8 شرائط

محلول الاقتران: ستربتافيدين-بيروكسيداز فجل الخيل 6 مل

محلول الغسل (يكفي لـ 30 مرة) 20 مل

أضداد CTX-1 موسومة بالبيوتين 1 مل

محلول مولد اللون A 6 مل

محلول مولد اللون B 6 مل

محلول الإيقاف 6 مل

كتيب تعليمات \

أوراق لاصقة لإغلاق سطح المصفوفة عند الحضان

أكياس بلاستيكية قابلة للإغلاق

إجراءات المقايسة

أ- تمديد المعاريات

هذه العتيدة تُوفر محلولاً معيارياً أصلياً، يمدد حسب التعليمات الواردة.

معياري رقم 5	120مكل معياري أصلي + 120مكل ممدد معياري	800 نغ/ مل
معياري رقم 4	120مكل معياري رقم 5 + 120مكل ممدد معياري	400 نغ/ مل
معياري رقم 3	120مكل معياري رقم 4 + 120مكل ممدد معياري	200 نغ/ مل
معياري رقم 2	120مكل معياري رقم 3 + 120مكل ممدد معياري	100 نغ/ مل
معياري رقم 1	120مكل معياري رقم 2 + 120مكل ممدد معياري	50 نغ/ مل

حساسية الطريقة: 4.193 نانو غرام / مل.

مجال المقايسة: 6 - 1500 نانو غرام / مل.

تعليمات الإجراءات الأخرى هي نفسها الواردة في مقايسة DKK-1 و OC.

2. الدراسة الإحصائية

- استخدم اختبار T ستيوذنت للعينات المترابطة Paired Samples T Test، وهو مخصص لمقارنة متوسطي متغير ما لعينة وحيدة ولكن في فترتين مختلفتين أو في منطقتين مختلفتين (بين قيم مقدار الكثافة العظمية في فقرات الظهر وقيم مقدار الكثافة العظمية في منطقة الورك مثلاً).

- جرى التعبير عن القيم بالمتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري.

- اعتمدت $P < 0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً (بمستوى ثقة 95%).

- جرى استخدام معامل الارتباط بيرسون Pearson Correlation Coefficient لدراسة علاقة الارتباط بين متغيرات المجموعة الواحدة.

- جرى استخدام معامل الارتباط سبيرمان Spearman Correlation Coefficient لدراسة الارتباط بين متغيرات من النوع الفئوي المتدرج أو مع متغيرات لبارمترية (مثل درجة التخلخل العظمي مثلاً).

- جرى استخدام اختبار Wilcoxon للرتب ذات الإشارة الجبرية لدراسة دلالة الفروق بين درجة التخلخل في الفقرات الظهرية ودرجة التخلخل في الورك.

- جرى حساب معاملات معادلة الانحدار الخطي Linear Regression Model لدراسة علاقة الارتباط بين المتغيرات الثلاثة المقاسة.

- في بعض الجداول وردت عبارة "توجد فروق يعتد بها" (تحتها خط منقط)، وهذا يعني أن الفروق الموجودة دالة فقط عند مستوى الثقة 95%، وهي غير دالة عند مستوى الثقة 99%، أي أن القرار الإحصائي المتخذ في الفقرات الموافقة يختلف باختلاف مستوى الثقة المعتمد في الدراسة، فلو اعتمدنا مستوى الثقة 99% يصبح القرار الإحصائي "لا توجد فروق يعتد بها إحصائياً".

جرى التأكد من توزيع كل من المتغيرات المدروسة وفقاً للمنحنى الطبيعي (وهو أحد شروط استخدام اختبار T ستيوذنت) باستخدام اختبار Kolmogorov-Smirnov، يعتمد هذا الاختبار على الفرض الصفري والفرض البديل التالي: الفرض الصفري H_0 : المجتمع يتبع التوزيع الطبيعي، الفرض البديل H_1 : المجتمع لا يتبع التوزيع الطبيعي. ويعتمد الباحث في اتخاذ القرار برفض أو قبول فرضية العدم H_0 على قيمة تدعى قيمة Sig.

3 - النتائج

جرى قياس مقدار الكثافة العظمية حسب المقياس T-score ومقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD في منطقتين اثنتين مختلفتين (في منطقة فقرات الظهر، في منطقة الورك) وجرى تحديد درجة تخلخل العظم مرتين اثنتين، إحداهما كانت اعتماداً على قيم الكثافة العظمية حسب المقياس T والأخرى اعتماداً على قيم مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD في كل من منطقة فقرات الظهر ومنطقة الورك لكل مريضة في عينة البحث.

كما جرى قياس كل من تركيز OC، CTX-1 وتركيز DKK1 لكل مريضة في عينة البحث.

جرى التأكد من توزيع كل من المتغيرات المدروسة وفقاً للمنحنى الطبيعي (وهو أحد شروط استخدام اختبار T-student) باستخدام اختبار Kolmogorov-Smirnov. ولقد جرى إعطاء كل من درجات تخلخل العظم قيمةً متزايدة تصاعدياً وفقاً لتخلخل العظم كما في الجدول 3.

الجدول 3: الدرجات المعتمدة لتخلخل العظم في عينة البحث والقيم الموافقة المعطاة لكل درجة.

القيمة الموافقة المعطاة	درجة تخلخل العظم
1	كثافة عظمية طبيعية
2	قلة عظم
3	تخلخل عظم

ثم درست العلاقة بين قيم تركيز DKK1 وكل من المتغيرات الأخرى، كما درست العلاقة بين المتغيرات في عينة البحث وكانت نتائج التحليل كما يلي:

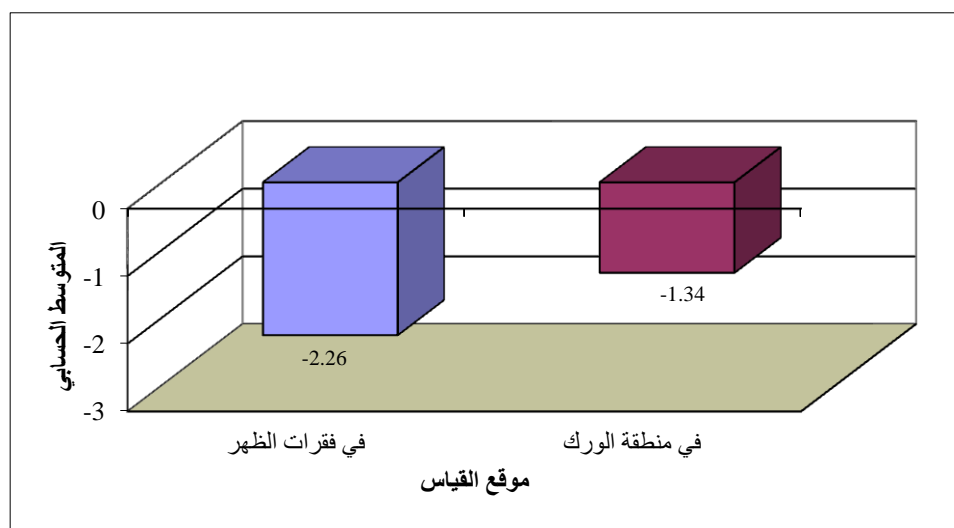
3.1. تعيين مقدار الكثافة العظمية حسب T-score

قيست الكثافة العظمية في فقرات الظهر وفي عظم الفخذ وحسب المتوسط الحسابي لكل منها وكذلك الانحراف المعياري والخطأ المعياري ويبين الجدول 4 النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول 4: المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لمقدار الكثافة العظمية حسب T score في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس (فقرات الظهر أو الورك).

الحد الأعلى	الحد الأدنى	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	عدد المريضات	موقع القياس	المتغير المدروس
1.29	-4.98	0.14	1.21	-2.26	77	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة العظمية حسب T-score
2.09	-3.92	0.12	1.08	-1.34	77	في منطقة الورك	

كما يبين الشكل 4 المتوسط الحسابي للكثافة العظمية في عظم الفخذ وفقرات الظهر.



الشكل 4: متوسط مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

3.1.1. دراسة تأثير موقع القياس على قيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score

وفقاً للمجموعة المدروسة

أجري اختبار T-student للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في فقرات الظهر ومتوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في عظم الفخذ في عينة البحث، فجاءت النتائج كما هو مبين في الجدول 5.

الجدول 5: نتائج اختبار T ستيوذنت للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في فقرات الظهر ومتوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في عظم الفخذ في عينة البحث.

المقارنة في قيم الكثافة العظمية حسب T-score بين المنطقتين:	الفرق بين المتوسطين	قيمة t المحسوبة	درجات الحرية	قيمة P	دلالة الفروق
منطقة فقرات الظهر – منطقة الورك	-0.92	-6.470	76	0.0001	توجد فروق يعتد بها إحصائياً

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق يعتد بها إحصائياً بين متوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في فقرات الظهر ومتوسط مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في منطقة الورك في عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية للفرق بين المتوسطين سالبة نستنتج أن مقدار الكثافة العظمية حسب T-score (بالقيم المطلقة) في منطقة فقرات الظهر كانت أكبر منها في منطقة الورك في عينة البحث.

3.1.2. دراسة العلاقة بين عمر المريضة ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس

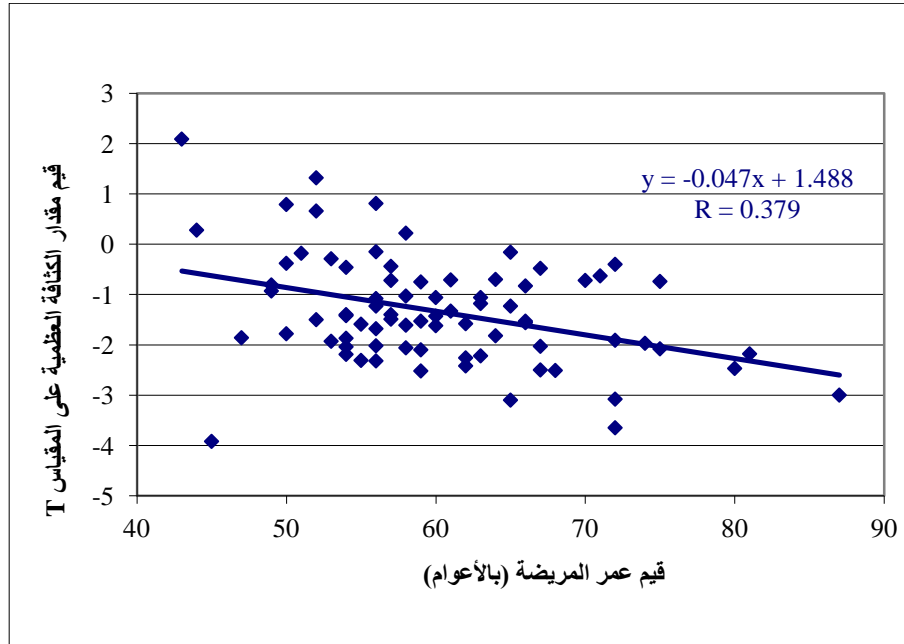
حُسب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في عينة البحث، وفقاً لموقع القياس فحصلنا على النتائج المبينة في الجدول 6.

الجدول 6: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = عمر المريضة (بالأعوام)			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.632	77	-0.055	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة العظمية حسب T-score
ضعيفة	عكسية	توجد علاقة يعتد بها إحصائية	0.001	77	-0.379	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 في منطقة الورك، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد علاقة ارتباط خطية يعد بها إحصائياً بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في منطقة الورك في عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية لمعامل الارتباط الموافق كانت سالبة نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت عكسية (ازدياد قيم عمر المريضة يوافق تناقص في قيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score). وبما أن القيمة المطلقة لمعامل الارتباط الموافق كانت قريبة من القيمة 0.4 نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت ضعيفة الشدة ويمكن إهمالها في عينة البحث.

أما بالنسبة لمعامل الارتباط الموافق لمنطقة فقرات الظهر، فيلاحظ أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية يعد بها إحصائياً بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في منطقة فقرات الظهر في عينة البحث (الشكل 5).



الشكل 5: انتشار قيم مقدار الكثافة العظمية حسب T-score في منطقة الورك وفقاً لقيم عمر المريضة (بالأعوام).

3.1.3. دراسة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score وفقاً لموقع القياس في عينة البحث
 جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، وكانت النتائج كما هو مبين بالجدول 7.
 الجدول 7: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = منسب كتلة الجسم BMI			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.140	77	0.170	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة العظمية حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.339	77	0.110	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباطية يعتد بها إحصائياً بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

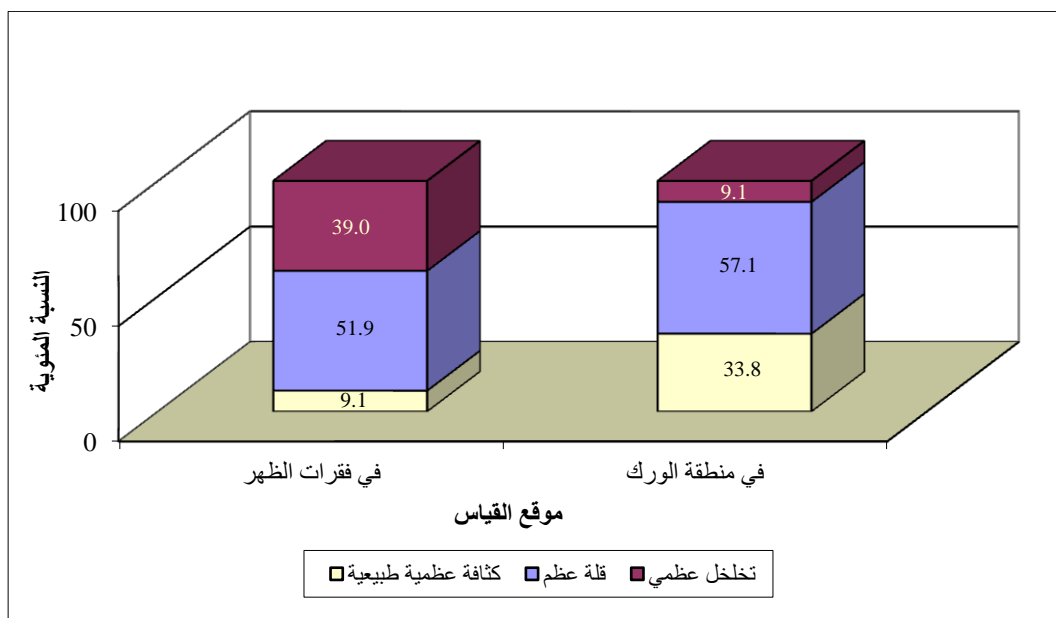
3.2. دراسة درجة تخلخل العظم حسب T-score

3.2.1. نتائج تحديد درجة تخلخل العظم في عينة البحث وفقاً لموقع القياس
 جرى تبويب نتائج تحديد درجة تخلخل العظم ضمن مجموعات ثلاث: كثافة عظمية طبيعية و قلة عظم وتخلخل عظم (الجدول 8)
 الجدول 8 : نتائج تحديد درجة تخلخل العظم في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

النسبة المئوية				عدد المريضات				موقع القياس
المجموع	تخلخل عظم	قلة عظم	كثافة عظمية طبيعية	المجموع	تخلخل عظمي	قلة عظم	كثافة عظمية طبيعية	
100	39.0	51.9	9.1	77	30	40	7	في منطقة فقرات الظهر

النسبة المئوية			عدد المريضات				موقع القياس	
المجموع	تخلخل عظم	قلّة عظم	كثافة عظمية طبيعية	المجموع	تخلخل عظمي	قلّة عظم		كثافة عظمية طبيعية
100	9.1	57.1	33.8	77	7	44	26	في منطقة الورك

كما يبين الشكل 6 النسبة المئوية لكل درجة من درجات تخلخل العظم، في منطقة فقرات الظهر، وفي عظم الفخذ.



الشكل 6: النسبة المئوية لدرجة تخلخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

3. 2. 2. دراسة تأثير موقع القياس على درجة تخلخل العظم حسب T-score وفقاً للمجموعة المدروسة

أجري اختبار Wilcoxon للرتب ذات الإشارة الجبرية لدراسة دلالة الفروق بين تكرارات درجة تخلخل العظم، حسب T-score في منطقة فقرات الظهر، وتكرارات درجة تخلخل العظم، حسب T-score في منطقة الورك في عينة البحث كما يلي:

أ- إحصاءات الرتب

تبرز هذه الإحصاءات المقارنة بين درجة تخلخل العظم في منطقة فقرات الظهر، وفي عظم

الفخذ (الجدول 9).

الجدول 9: الرتب ذات الإشارة الجبرية لدرجة تداخل العظم حسب T-score في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس.

متوسط الرتب	عدد المريضات	الرتب ذات الإشارة الجبرية
23.57	43	درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الورك > درجة تداخل العظم حسب T-score في فقرات الظهر
22.50	3	درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الورك < درجة تداخل العظم حسب T-score في فقرات الظهر
	31	درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الورك = درجة تداخل العظم حسب T-score في فقرات الظهر
	77	المجموع

ب- نتائج اختبار Wilcoxon للرتب ذات الإشارة الجبرية تظهر نتيجة مقارنة تداخل العظم بين منطقتي فقرات الظهر والورك. قيمة $z = -5.821$ وكان الفرق معنداً به إحصائياً (الجدول 10).

الجدول 10: نتائج اختبار Wilcoxon للرتب ذات الإشارة الجبرية لدراسة دلالة الفروق بين تكرارات درجة تداخل العظم حسب المقياس T في منطقة فقرات الظهر وتكرارات درجة تداخل العظم حسب المقياس T في منطقة الورك في عينة البحث.

مقارنة درجة التداخل العظمي حسب T-score بين منطقتي القياس:	قيمة Z	قيمة P	دلالة الفروق
منطقة فقرات الظهر – منطقة الورك	-5.821	$0.0001 >$	<u>توجد فروق يعند بها إحصائياً</u>

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق يعند بها إحصائياً بين تكرارات درجة تداخل العظم، حسب T-score، في منطقة فقرات الظهر وتكرارات درجة تداخل العظم حسب T-score، في منطقة الورك في عينة البحث. وبدراسة الرتب ذات الإشارة الجبرية يُلاحظ أن عدد الرتب السالبة

(التي كانت فيها درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الورك أقل من درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة فقرات الظهر) أكبر من عدد الرتب الموجبة (التي كانت فيها درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الورك أعلى من درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة فقرات الظهر). وبالتالي نستنتج أن درجة تداخل العظم حسب T-score في منطقة الظهر كانت أكبر منها في منطقة الورك في عينة البحث.

3. 2. 3. دراسة العلاقة بين عمر المريضة ودرجة تداخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس

جرى حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) ودرجة تداخل العظم، حسب T-score، في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، فجاءت النتائج كما هو مبين في الجدول 11.

الجدول 11: نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = عمر المريضة (بالأعوام)			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.426	77	0.092	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD حسب T-score
ضعيفة	طردية	توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.026	77	0.254	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر من القيمة 0.05 في منطقة الورك، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائية بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) ودرجة تداخل العظم، حسب T-score، في منطقة الورك في عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية لمعامل الارتباط الموافق كانت موجبة نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت طردية (ازدياد قيم عمر المريضة يوافق ارتفاع درجة تداخل العظم حسب T-score)، وبما أن القيمة المطلقة لمعامل الارتباط الموافق كانت قريبة من القيمة 0.3 نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت ضعيفة الشدة ويمكن إهمالها في عينة البحث.

أما بالنسبة لمعامل الارتباط الموافق لمنطقة فقرات الظهر فيلاحظ أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية يعتد بها إحصائياً بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) ودرجة التخلخل العظمي، حسب T-score، في منطقة فقرات الظهر في عينة البحث.

3.2.4. دراسة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة تخلخل العظم حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس جرى حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة تخلخل العظم، حسب المقياس T، في عينة البحث وفقاً لموقع القياس وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول 12.

الجدول 12: نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة تخلخل العظم، حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = منسب كتلة الجسم BMI			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.123	77	-0.177	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD حسب المقياس T
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.219	77	-0.142	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين قيم منسب كتلة الجسم BMI ودرجة تخلخل العظم، حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

3.3. دراسة مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD

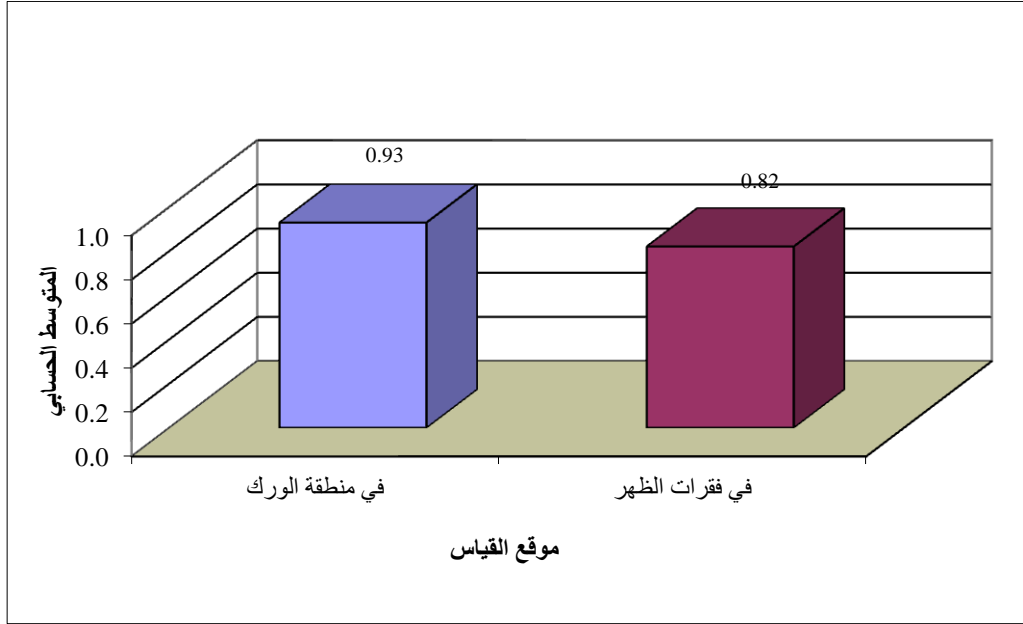
3.3.1. نتائج قياس قيم BMD وفقاً لموقع القياس

حسب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري للكثافة العظمية لدى أفراد

الدراسة (الجدول 13). ويظهر الشكل 7 قيم متوسط BMD في منطقتي الورك و فقرات الظهر لدى أفراد الدراسة.

الجدول 13: المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري لمقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD في عينة البحث، وذلك وفقاً لموقع القياس.

المتغير المدروس	موقع القياس	عدد المريضات	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الخطأ المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD	في منطقة فقرات الظهر	77	0.82	0.13	0.01	0.509	1.23
	في منطقة الورك	77	0.93	0.15	0.02	0.603	1.355



الشكل 7: متوسط مقدار الكثافة المعدنية للعظم حسب BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

3.3.2. دراسة تأثير موقع القياس على قيم BMD وفقاً للمجموعة المدروسة
أجري اختبار T student للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط قيم BMD في فقرات الظهر، ومتوسط قيم BMD في منطقة الورك في عينة البحث، وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول 14.

الجدول 14: نتائج اختبار T-student للعينات المترابطة لدراسة دلالة الفروق بين متوسط قيم الكثافة المعدنية للعظم BMD في فقرات الظهر ومتوسط BMD في منطقة الورك في عينة البحث.

المقارنة في قيم الكثافة المعدنية للعظم BMD بين المنطقتين:	الفرق بين المتوسطين	قيمة t المحسوبة	درجات الحرية	قيمة P	دلالة الفروق
منطقة فقرات الظهر – منطقة الورك	-0.11	6.277	76	0.0001	توجد فروق يعدت بها إحصائياً

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق دالة إحصائياً بين متوسط قيم BMD في فقرات الظهر، ومتوسط قيم BMD في منطقة الورك في عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية للفروق بين المتوسطين موجبة نستنتج أن مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD في منطقة الورك، كانت أكبر منها في منطقة الظهر في عينة البحث.

3.4 دراسة العلاقة بين قيم T-score وقيم BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس

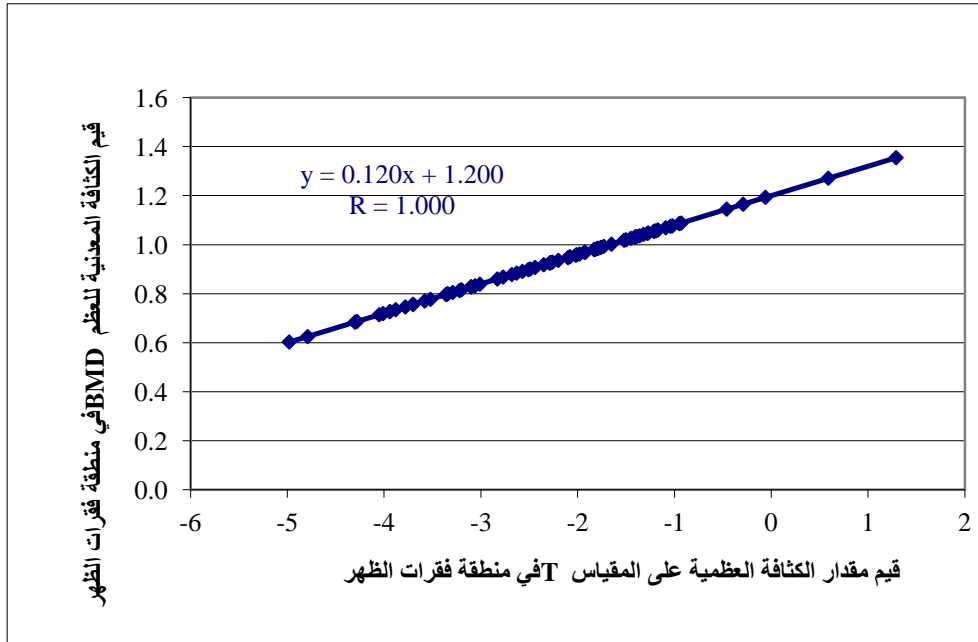
أجري حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مقدار الكثافة العظمية، حسب T-score، وقيم BMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس. وتظهر النتائج واضحة في الجدول 15.

الجدول 15: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين الكثافة العظمية حسب T-score وBMD في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

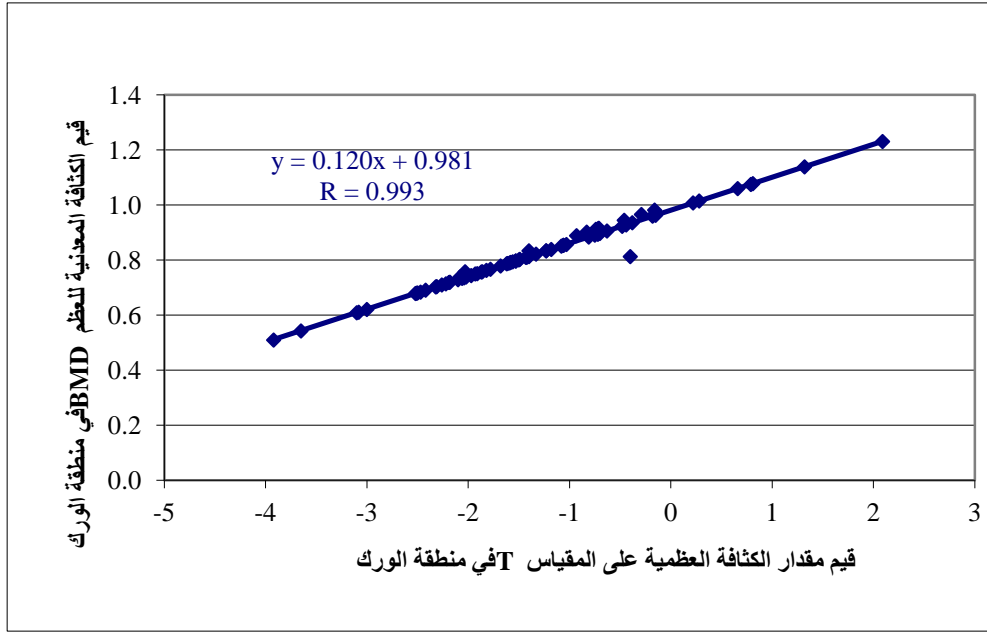
شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = الكثافة العظمية حسب القياس T-score			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
شبه تامة	طردية	توجد علاقة يعدت بها إحصائياً	0.0001>	77	1.000	في منطقة فقرات الظهر	مقدار BMD
شبه تامة	طردية	توجد علاقة يعدت بها إحصائياً	0.0001>	77	0.993	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس (في منطقة فقرات الظهر، في منطقة الورك). أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين الكثافة العظمية، حسب T-score، وحسب قيم BMD في عينة البحث، مهما كان موقع القياس. وبما أن الإشارة الجبرية لمعامل الارتباط المحسوبين موجبة نستنتج أن كلاً من العلاقتين الموافقتين كانت طردية (ارتفاع قيم الكثافة العظمية حسب المقياس T يوافق ارتفاعه في قيم الكثافة المعدنية للعظم BMD)، وبما أن القيم المطلقة لكل من معاملي الارتباط المحسوبين كانت قريبة من الواحد الصحيح أو تساويه نستنتج أن كلاً من العلاقتين الموافقتين كانت شبه تامة في عينة البحث. وبما أن العلاقة بين المتغيرين المذكورين كانت شبه تامة من حيث الشدة قد يُكتفى إن شاء الله تعالى بدراسة أحدهما.

ويبين الشكلان 8 و 9 الارتباط بين الكثافة العظمية حسب T-score والكثافة حسب BMD في منطقتي فقرات الظهر والورك، ($r = 1$ ، $r = 0.993$ ، على الترتيب).



الشكل 8: انتشار قيم BMD وفقاً لقيم T-score في فقرات الظهر.



الشكل 9: انتشار قيم BMD وفقاً لقيم T-score في منطقة الورك.

3.5. دراسة نتائج مقايسات Dkk-1 و OC و CTX-1 المُجرأة لمريضات عينة البحث

3.5.1. نتائج قياس كل من Dkk-1 و OC و CTX-1

جرى التعبير عن نتائج قياس كل من Dkk-1 و OC و CTX-1 بحساب قيم المتوسط والانحراف المعياري والخطأ المعياري لكل منهم لدى أفراد الدراسة (الجدول 16).

الجدول 16: المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.

الحد الأعلى	الحد الأدنى	الخطأ المعياري	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	عدد المريضات	المتغير المدروس
318	24	6.45	56.63	89.65	77	تركيز OC (ng/ml)
1852	190	41.10	360.65	567.41	77	تركيز CTX-1 (ng/ml)
140	19	3.19	28.02	46.11	77	تركيز DKK1 (ng/ml)

3.5.2. دراسة العلاقة بين عمر المريضة وكل من Dkk-1 و OC و CTX-1 في عينة البحث

جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث،

فحصلنا على النتائج المبينة في الجدول 17.

الجدول 17: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = عمر المريضة (بالأعوام)			المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط	
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.952	77	-0.007	تركيز OC
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.803	77	0.029	تركيز CTX-1
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.635	77	0.055	تركيز DKK1

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية يعتد بها إحصائياً بين قيم عمر المريضة (بالأعوام) وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز البروتين DKK1 في عينة البحث.

3.5.3. دراسة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وكل من Dkk-1 و OC و CTX-1 في عينة البحث
جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث، ويبين الجدول 18 النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول 18: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم كل من تركيز البروتين OC ، CTX-1 وتركيز البروتين DKK1 في عينة البحث.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = مشعر كتلة الجسم BMI			المتغير الثاني
			قيمة مستوى الدلالة	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط	
-	-	لا توجد علاقة دالة يعتد بها إحصائياً	0.780	77	0.032	تركيز OC
-	-	لا توجد علاقة دالة يعتد بها إحصائياً	0.805	77	-0.029	تركيز CTX-1
-	-	لا توجد علاقة دالة يعتد بها إحصائياً	0.914	77	-0.013	تركيز DKK1

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية يعتد بها إحصائياً بين قيم منسب كتلة الجسم BMI وقيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.

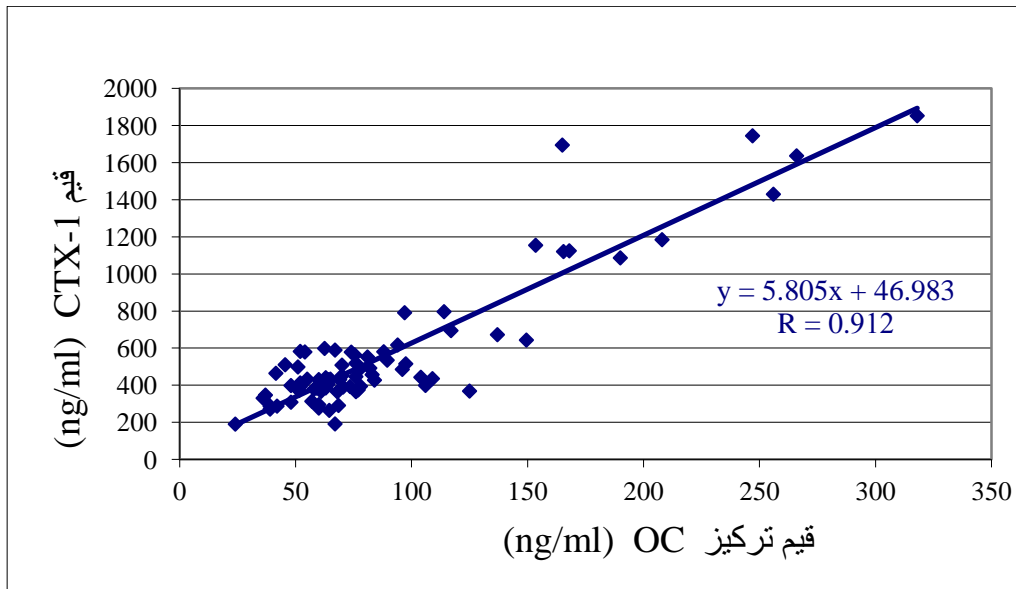
3.5.4. دراسة العلاقة بين المتغيرات المتعلقة بالتحاليل الدموية في عينة البحث جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم كل من تركيز OC وCTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث فحصلنا على النتائج المبينة في الجدول 19.

الجدول 19: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1 في عينة البحث.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز البروتين OC			المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط	
قوية	طرديّة	توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.0001>	77	0.912	تركيز CTX-1
قوية	طرديّة	توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.0001>	77	0.916	تركيز DKK1

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = البروتين CTX-1			المتغير الثاني
			قيمة مستوى الدلالة	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط	
شبه تامة	طردية	توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.0001 >	77	0.955	تركيز DKK1

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05 بالنسبة لجميع معاملات الارتباط المحسوبة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد علاقة ارتباط خطية يعتد بها إحصائياً بين قيم كل من تركيز OC وتركيز CTX-1 وتركيز DKK1، وبما أن الإشارة الجبرية لمعاملات الارتباط المحسوبة كانت موجبة نستنتج أن كلاً من العلاقات الموافقة كانت طردية (ارتفاع قيم تركيز OC يوافق ارتفاعه في قيم كل من CTX-1 و DKK1، وارتفاع قيم CTX-1 يوافق ارتفاعه في تركيز DKK1)، وبما أن القيم المطلقة لمعاملات الارتباط الموافقين للعلاقتين بين قيم تركيز OC وكل من CTX-1 وتركيز DKK1 كانت قريبة من القيمة 0.9 نستنتج أن كلاً من العلاقتين الموافقتين كانت قوية الشدة، وبما أن القيمة المطلقة لمعامل الارتباط الموافق للعلاقة بين قيم CTX-1 وقيم DKK1 كانت قريبة من الواحد الصحيح نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت شبه تامة من حيث الشدة في عينة البحث. ويبين الشكل 10 العلاقة بين تراكيز OC و CTX-1 لدى أفراد عينة البحث.



الشكل 10: انتشار قيم تركيز CTX-1 وفقاً لقيم تركيز OC في عينة البحث.

- دراسة إمكانية التنبؤ بقيم تركيز OC اعتماداً على قيم تركيز DKK1 في عينة البحث
 بما أن العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم تركيز DKK1 كانت علاقة خطية يعتد بها
 إحصائياً، أُجري اختبار تحليل التباين ANOVA لدراسة دلالة تمثيل العلاقة بين تركيز
 OC و تركيز DKK1 بمعادلة من الدرجة الأولى من الشكل (ع = أ × س + ب)، وتم
 حساب قيم معامل الارتباط R بين تركيز OC ومقدار تركيز DKK1 لتقدير درجة التمثيل
 للمعادلة المذكورة. وأجري حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار (أ) و(ب) للتنبؤ بقيم
 تركيز OC من خلال قيم تركيز DKK1 بمعادلة من الشكل (ع = أ × س + ب) حيث ع
 تمثل قيم تركيز البروتين OC المراد حسابها وس تمثل قيم مقدار تركيز البروتين DKK1
 في عينة البحث، ويلخص الجدول 20 النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول 20: نتائج اختبار تحليل التباين ANOVA ونتائج حساب قيم معامل الارتباط R بين تركيز
 OC وتركيز DKK1 في عينة البحث.

المتغير التابع = تركيز OC					المتغير المستقل
درجة تمثيل معادلة مستقيم الانحدار	قيمة معامل التحديد R ²	قيمة معامل الارتباط	دلالة تمثيل قيم تركيز البروتين OC بقيم تركيز البروتين DKK1	قيمة F المحسوبة	
قوية	0.838	0.916	تمثيل يعتد به إحصائياً	388.960	تركيز DKK1

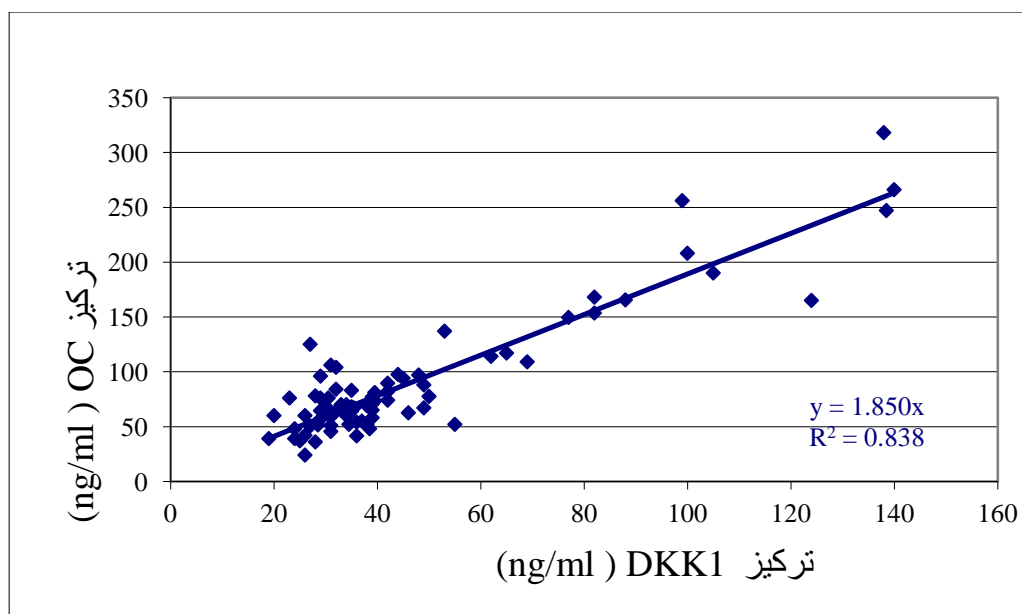
يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة P كانت أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند
 مستوى الثقة 95% يمكن تمثيل العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم تركيز DKK1 بمعادلة
 من الشكل ع = أ × س + ب، تمثيلاً يعتد به إحصائياً، ويُلاحظ أن قيمة معامل التحديد R²
 كانت قريبة من القيمة 0.9، مما يدل على أن درجة تمثيل العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم
 تركيز DKK1 بمعادلة من الشكل ع = أ × س + ب كانت قوية الشدة في عينة البحث،
 وبالتالي يمكن الاعتماد على قيم تركيز DKK1 في التنبؤ بقيم تركيز OC في عينة البحث.
 يظهر الجدول 21 نتائج حساب معاملات مستقيم الانحدار بين تراكييز OC وDKK1.

الجدول 21: نتائج حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار بين تركيز OC و تركيز DKK1 في عينة البحث.

المتغير المستقل	المعامل المدروس	المتغير التابع = تركيز OC			
		قيمة المعامل المحسوبة	الخطأ المعياري	قيمة t المحسوبة	قيمة P
تركيز DKK1	ب	4.332	5.053	0.857	0.394
	أ	1.850	0.094	19.722	>0.0001

نلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05 بالنسبة للمعامل ب، وبالتالي فإنه عند مستوى الثقة 95% لا تدخل قيمة المعامل ب في معادلة مستقيم الانحدار الموافقة في عينة البحث.

أما بالنسبة للمعامل (أ) فيلاحظ أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05، وبالتالي فإنه عند مستوى الثقة 95% تدخل قيمة المعامل أ في معادلة مستقيم الانحدار الموافقة، وبالتالي نستنتج أنه يمكن تمثيل العلاقة بين قيم تركيز OC و تركيز DKK1 بمعادلة من الشكل [تركيز OC = 1.85 × تركيز DKK1] في عينة البحث. ويبين الشكل 11 انتشار قيم تركيز OC وفقاً لقيم تراكيكز DKK1 في عينة البحث.



الشكل 11: انتشار قيم تركيز OC وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.

- دراسة إمكانية التنبؤ بقيم CTX-1 اعتماداً على قيم تركيز DKK1 في عينة البحث
 بما أن العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم تركيز DKK1 كانت علاقة خطية معتد بها
 إحصائياً، فلقد أُجري اختبار تحليل التباين ANOVA لدراسة الاعتداد بتمثيل العلاقة بين
 قيم CTX-1 ومقدار تركيز DKK1 بمعادلة من الدرجة الأولى، من الشكل $E = A \times S + B$
 + ب. وجرى حساب قيم معامل الارتباط R بين تركيز CTX-1 و تركيز DKK1 لتقدير
 درجة التمثيل للمعادلة المذكورة، كما جرى حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار أ و ب
 للتنبؤ بقيم CTX-1، من خلال قيم مقدار تركيز البروتين DKK1، بمعادلة من الشكل $E =$
 $A \times S + B$ ، حيث ع تمثل قيم CTX-1 المراد حسابها وس تمثل قيم تركيز DKK1 في
 عينة البحث، وجاءت النتائج كما هو مبين في الجدول 22.

الجدول 22: نتائج اختبار تحليل التباين ANOVA ونتائج حساب قيم معامل التحديد R^2 بين CTx-1
 و تركيز DKK1 في عينة البحث.

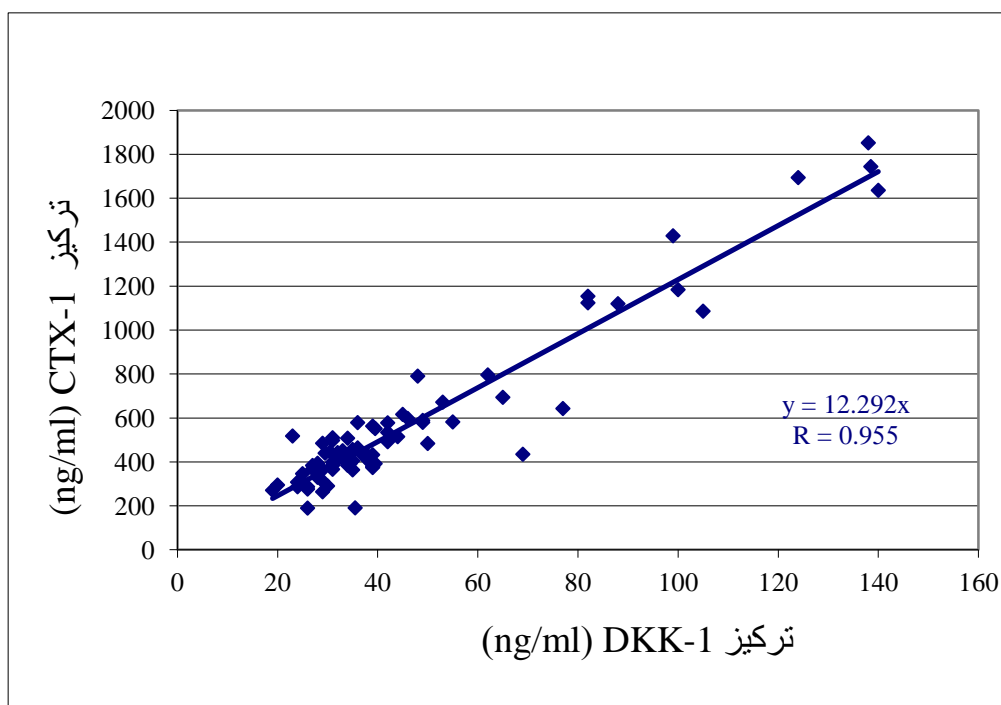
المتغير التابع = CTX-1					المتغير المستقل
درجة تمثيل معادلة مستقيم الانحدار	قيمة معامل التحديد R^2	قيمة معامل الارتباط	دلالة تمثيل قيم CTX-1 بقيم تركيز DKK1	قيمة F المحسوبة	
قوية	0.912	0.955	<u>تمثيل يعتد به إحصائياً</u>	780.315	تركيز DKK1

يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة P كانت أصغر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند
 مستوى الثقة 95% يمكن تمثيل العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم تركيز DKK1 بمعادلة من
 الشكل $E = A \times S + B$ ، تمثيلاً دالاً إحصائياً. ويُلاحظ أن قيمة معامل التحديد R^2 كانت
 قريبة من القيمة 0.9، مما يدل على أن درجة تمثيل العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم تركيز
 DKK1 بمعادلة من الشكل $E = A \times S + B$ ، كانت قوية الشدة في عينة البحث، وبالتالي
 يمكن الاعتماد على قيم تركيز DKK1 في التنبؤ بقيم CTX-1 في عينة البحث. ويبين
 الجدول 23 نتائج حساب معاملات مستقيم الانحدار.

الجدول 23: نتائج حساب قيم معاملات مستقيم الانحدار بين قيم CTX-1 و تركيز DKK1 في عينة البحث.

المتغير التابع = تركيز CTX-1						المعامل المدروس	المتغير المستقل
شكل معادلة مستقيم الانحدار	دلالة وجود المعامل في المعادلة	قيمة P	قيمة t المحسوبة	الخطأ المعياري	قيمة المعامل المحسوبة		
تركيز CTX-1 = 12.292 × تركيز DKK1	لا يعتد بها إحصائياً	0.979	0.026	23.702	0.617	ب	تركيز DKK1
	يعتد بها إحصائياً	0.0001 >	27.934	0.440	12.292	أ	

نلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة P أصغر بكثير من القيمة 0.05 بالنسبة للمعامل أ، وبالتالي فإنه عند مستوى الثقة 95% يدخل المعامل أ في معادلة مستقيم الانحدار الموافقة، وبالتالي نستنتج أنه يمكن تمثيل العلاقة بين قيم CTX-1 و تركيز DKK1 بمعادلة من الشكل [CTX-1 = 12.292 × مقدار تركيز البروتين DKK1] في عينة البحث. كما يظهر الشكل 12 العلاقة بين تراكيز CTX-1 و DKK-1 لدى أفراد الدراسة.



الشكل 12: انتشار قيم CTX-1 وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.

3. 5. 5. دراسة العلاقة بين DKK-1 و OC و CTX-1 المقاسة والكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس

أ- دراسة العلاقة بين قيم تركيز البروتين OC ومقدار الكثافة العظمية حسب المقياس T في عينة البحث وفقاً لموقع القياس
أجري حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم الكثافة العظمية، حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، فحصلنا على النتائج المبينة في الجدول 24.

الجدول 24: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز OC وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز البروتين OC			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة p	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.586	77	0.063	في منطقة فقرات الظهر	الكثافة العظمية حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.811	77	0.028	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم تركيز OC وقيم الكثافة العظمية حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

ب- دراسة العلاقة بين قيم CTX-1 ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس
جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول 25.

الجدول 25: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز CTX-1			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة p	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.896	77	0.015	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة العظمية حسب المقياس T
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.787	77	0.031	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباطية خطية يُعتد بها إحصائياً بين قيم CTX-1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

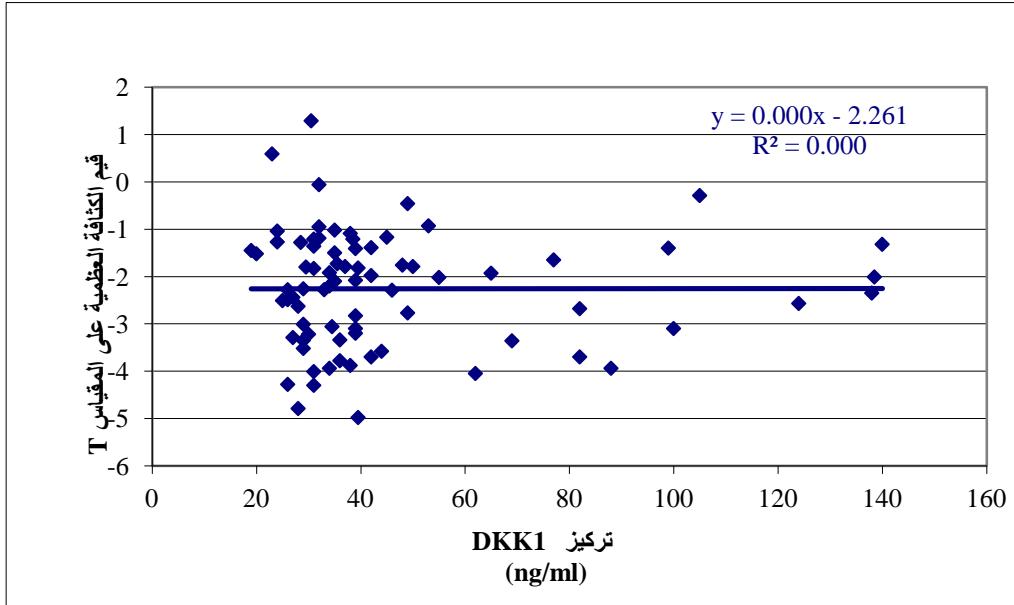
ج- دراسة العلاقة بين قيم تركيز البروتين DKK1 ومقدار الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس جرى حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز DKK1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، ويبين الجدول 26 النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول 26: نتائج حساب معامل الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز DKK1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

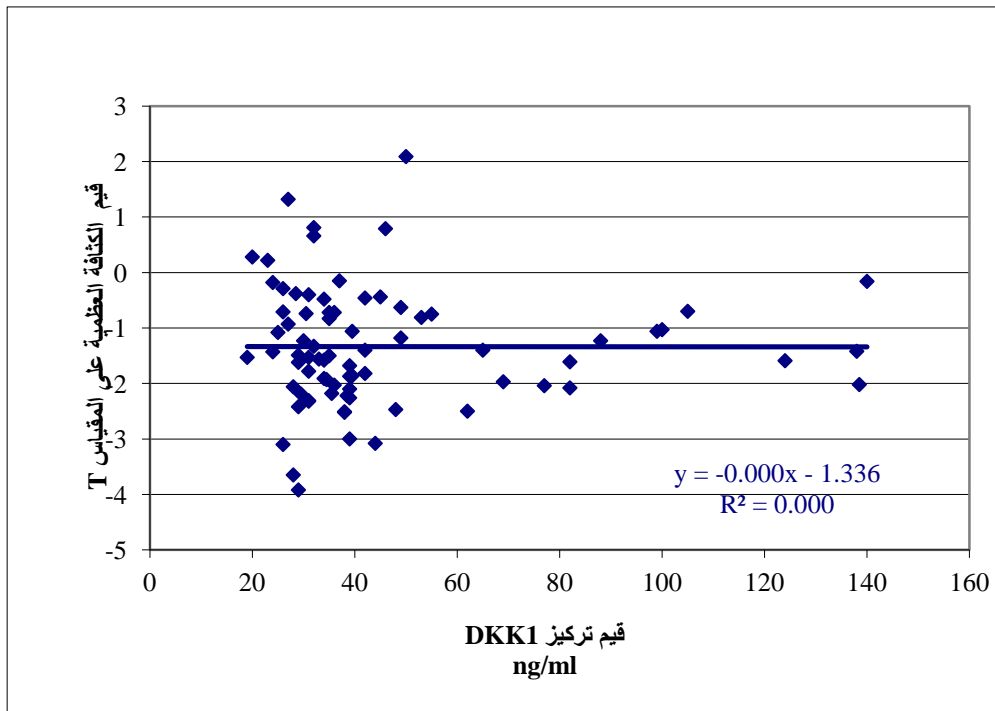
شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز البروتين DKK1			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة p	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.992	77	0.001	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة العظمية حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يُعتد بها إحصائياً	0.996	77	-0.001	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي

أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباطية يعتد بها إحصائياً بين قيم تركيز DKK1 وقيم الكثافة العظمية حسب T-score، مهما كان موقع القياس في عينة البحث. ويظهر الشكلان 13 و 14 العلاقة بين قيم DKK-1 المصلية وقيم الكثافة العظمية لدى أفراد الدراسة.



الشكل 13: انتشار قيم T-score في فقرات الظهر وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.



الشكل 14: انتشار قيم T-score في منطقة الورك وفقاً لقيم تركيز DKK1 في عينة البحث.

3. 5. 6. دراسة العلاقة بين قيم DKK-1 و OC و CTX-1 المقاسة ودرجة التخلخل العظمي

أ- دراسة العلاقة بين تركيز OC ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس
جرى حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم تركيز OC ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، ويظهر الجدول 27 النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول 27: نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين تركيز OC ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز البروتين OC			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.703	77	-0.044	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها	0.747	77	0.037	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين تركيز OC ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

ب- دراسة العلاقة بين تراكيز CTX-1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس
جرى حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، وتظهر النتائج واضحة في الجدول 28.

جدول رقم (28) نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم CTX-1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تراكيز CTX-1			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.662	77	-0.051	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.353	77	-0.107	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين قيم CTX-1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

ج- دراسة العلاقة بين تركيز DKK1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس جرى حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين تركيز DKK1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس، وكانت النتائج كما هو واضح في الجدول 29.

الجدول 29: نتائج حساب معامل الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين تركيز DKK1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score في عينة البحث وفقاً لموقع القياس.

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = تركيز البروتين DKK1			موقع القياس	المتغير الثاني
			قيمة P	عدد المريضات	قيمة معامل الارتباط		
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.821	77	0.026	في منطقة فقرات الظهر	مقدار الكثافة المعدنية للعظم BMD حسب T-score
-	-	لا توجد علاقة يعتد بها إحصائياً	0.522	77	0.074	في منطقة الورك	

يبين الجدول أعلاه أن قيمة P أكبر بكثير من القيمة 0.05، مهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين تراكيز DKK1 ودرجة التخلخل العظمي حسب T-score مهما كان موقع القياس في عينة البحث.

3. 6. دراسة القيمة الإنذارية لكل من DKK-1 و OC و CTX-1
 3. 6. 1. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بالتخلخل العظمي حسب T-score في
 مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية .
 جرى حساب الحساسية والنوعية لقيم كل من Dkk-1 و OC و CTX على حدى، ثم جرى
 حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC، في كل من مجموعة المصابات بالتخلخل
 العظمي ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية، وكانت النتائج كما هو موضح
 بالجدول 29.

جدول 29: نتائج حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي
 ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية.

المتغير المدروس	موقع القياس	مقدار المساحة تحت منحنى ROC	الخطأ المعياري	قيمة مستوى الدلالة	دلالة التوافق	شدة التوافق
تركيز OC	في منطقة فقرات الظهر	0.629	0.104	0.295	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.591	0.128	0.467	لا يوجد تمييز	-
تركيز CTX-1	في منطقة فقرات الظهر	0.645	0.092	0.237	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.734	0.096	0.061	لا يوجد تمييز	-
تركيز DKK1	في منطقة فقرات الظهر	0.502	0.129	0.985	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.516	0.110	0.895	لا يوجد تمييز	-

يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05، مهما كان المتغير
 المدروس، ومهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا تعبر قيم كل من
 DKK1 و OC و CTX تعبيراً يعتد به إحصائياً عن الإصابة بالتخلخل العظمي في
 مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي، ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية
 حسب T-score، مهما كان موقع القياس المدروس في عينة البحث.

3. 6. 2. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بقلّة عظم حسب T-score في مجموعة المصابات بقلّة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية. جرى حساب الحساسية والنوعية لقيم من Dkk-1 و OC و CTX على حدى، ثم جرى حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC، في كل من مجموعة المصابات بقلّة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية، وكانت النتائج كما في الجدول 30.

جدول 30 نتائج حساب مقدار المساحة تحت المنحني في مجموعة المصابات بقلّة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية.

المتغير المدروس	موقع القياس	مقدار المساحة تحت منحنى ROC	الخطأ المعياري	قيمة مستوى الدلالة	دلالة التوافق	شدة التوافق
تركيز OC	في منطقة فقرات الظهر	0.682	0.085	0.128	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.412	0.071	0.220	لا يوجد تمييز	-
تركيز CTX-1	في منطقة فقرات الظهر	0.698	0.080	0.097	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.483	0.070	0.808	لا يوجد تمييز	-
تركيز DKK1	في منطقة فقرات الظهر	0.504	0.128	0.976	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.404	0.072	0.183	لا يوجد تمييز	-

يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05، مهما كان المتغير المدروس، ومهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا تعبر قيم كل من DKK1 و OC و CTX تعبيراً يعقد به إحصائياً عن الإصابة بقلّة العظم في مجموعة المصابات بقلّة عظم ومجموعة النساء ذوات الكثافة العظمية الطبيعية، حسب T-score، مهما كان موقع القياس المدروس في عينة البحث.

3. 6. 3. دراسة القيمة الإنذارية للإصابة بالتخلخل العظمي حسب T-score في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة المصابات بقلة عظم.

جرى حساب الحساسية والنوعية لقيم كل من Dkk-1 و OC و CTX على حدى، ثم جرى حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC، في كل من مجموعة المصابين بالتخلخل العظمي ومجموعة المصابين بقلة عظم في عينة البحث، وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول 31.

جدول 31 نتائج حساب مقدار المساحة تحت منحنى ROC في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة المصابات بقلة عظم.

المتغير المدروس	موقع القياس	مقدار المساحة تحت منحنى ROC	الخطأ المعياري	قيمة مستوى الدلالة	دلالة التوافق	شدة التوافق
تركيز OC	في منطقة فقرات الظهر	0.470	0.071	0.665	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.664	0.111	0.167	لا يوجد تمييز	-
CTX-1	في منطقة فقرات الظهر	0.468	0.070	0.643	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.719	0.088	0.065	لا يوجد تمييز	-
تركيز البروتين DKK1	في منطقة فقرات الظهر	0.478	0.070	0.749	لا يوجد تمييز	-
	في منطقة الورك	0.649	0.102	0.208	لا يوجد تمييز	-

يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05، مهما كان المتغير المدروس، ومهما كان موقع القياس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا تعبر قيم كل من DKK1 و OC و CTX تعبيراً يعتد به إحصائياً عن الإصابة بالتخلخل العظمي في مجموعة المصابات بالتخلخل العظمي ومجموعة المصابات بقلة عظم، مهما كان موقع القياس المدروس في عينة البحث.

4. المناقشة

1- وجدنا من خلال معطيات بحثنا هذا أن الكثافة العظمية في منطقة الفقرات الظهرية أقل منها في منطقة الورك. وأن درجة التخلخل العظمي في الفقرات الظهرية أكبر منها في عظم الورك، حيث بلغت النسبة المئوية للتخلخل العظمي 39 % في فقرات الظهر و9.1% في مفصل الورك. ولقد توافقت هذه النتيجة مع نتائج دراسة Kyung-Shik Lee وزملائه في كوريا عام 2014، التي وجدت أن نسبة انتشار تخلخل العظم في الفقرات الظهرية لدى النساء فوق سن 50 عاماً أكبر منها في مفصل الورك، ولقد بلغت نسبتها المئوية 24.4 % و19.2%، على الترتيب [109]. كذلك توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة Cui الكورية The Namwon Study عام 2008، التي وجدت أن نسبة انتشار تخلخل العظم كانت 40.1 % في الفقرات الظهرية لدى نساء بعمر 50-79 عاماً، و12.4 % في مفصل الورك [110]. وفي دراسة Cheng XG وزملائه عام 2007 كانت نسبة انتشار تخلخل العظم في فقرات الظهر لدى نساء فوق سن 50 عاماً تساوي 28%، وفي الورك 15%، أي أن الانتشار في فقرات الظهر أكبر منه في الورك وفي هذا توافقت نتائجها مع نتائج دراستنا [111]. وتفسر هذه النتيجة بأن الخسارة العظمية لدى النساء فوق سن 50 عاماً تكون أكثر حدةً في الفقرات الظهرية من المفصل الوركي، لذلك يُحدد انتشار تخلخل العظم عند النساء بشكل رئيسي في الفقرات الظهرية، وتعد التبدلات الحاصلة في مفصل الورك ذات تأثير قليل جداً على انتشار تخلخل العظم [109]. بينما تخالفت نتائجنا مع نتائج دراسة Aghaei M عام 2012 التي أجريت في إيران، والتي وجدت أن عدد النساء المصابات بالتخلخل العظمي، فوق سن 40 عاماً، في مفصل الورك أكبر من المصابات بالتخلخل في فقرات الظهر [112]. وقد يعزى الاختلاف بين دراستنا وهذه الدراسة إلى أن نسبة انتشار التخلخل العظمي تختلف باختلاف العرق وطبيعة الحياة والمدخول الغذائي.

2- وجدنا في دراستنا أن الكثافة العظمية لا ترتبط بعمر المريضة (مقدراً بالأعوام) في حال كان القياس في منطقة فقرات الظهر، بينما تكون العلاقة عكسية ضعيفة الشدة بين العمر والكثافة العظمية في مفصل الورك. لقد أظهر Rosales-Aujang E وزملاؤه عام 2014 في دراسة على 389 امرأة أنه لا علاقة للعمر كعامل اختطار في التخلخل العظمي وقلة العظم [113]. كما بين waugh EI وزملاؤه عام 2009 في دراسة أجريت في

كندا، عدم كفاية الأدلة التي تؤكد تدخل العمر كعامل اختطار يرتبط بانخفاض الكثافة العظمية [114]. قام Nilas L وزملاؤه بدراسة تأثير العمر وحالة انقطاع الطمث على الكتلة العظمية، فوجدوا أن النساء اللواتي بنفس العمر وبحالة انقطاع طمث مختلفة لديهن تفاوت كبير بالكتلة العظمية بينما اللواتي لديهن حالة انقطاع طمث متماثلة، لديهن حالة الكتلة العظمية نفسها تقريباً بفارق عمر 5 أعوام تقريباً، مما يدل على أنه للعمر تأثير ضعيف على حالة الكتلة العظمية [115]. لقد توافقت الدراسات السابقة مع دراستنا. كما جاء في دراسة Nagi R وزملائه عام 2014 أن الكثافة العظمية تتناقص في مفصل الورك مع التقدم بالعمر وهو موافق للنتيجة في دراستنا [116]. حيث يخضع العظم مع التقدم بالعمر إلى تبدلات عديدة نذكر منها: زيادة فعالية الخلايا العظمية مما يؤدي لعدم توازن بين التشكل والارتشاف، تبدل في البنية الميكروية الهندسية وتغير في الجغرافية العظمية الداخلية، حيث تحدث إعادة ترتيب لدعائم الترابيق العظمية وتكبر الأجواف داخل النقي على حساب العظم، تتراكم الكسور الصغروية العظمية، يحدث تباين في توزيع المعادن المترسبة وتبدل في الخصائص البلورية لهذه المعادن، كما تحدث تبدلات في المحتوى البروتيني للمطرس العظمي أيضاً، بالإضافة إلى هذه التبدلات هنالك تبدلات على مستوى الهرمونات التي تنظم الكالسيوم والفسفات [117]. قد تؤدي هذه التبدلات في النهاية إلى قلة عظم وتخلخل عظمي. أظهرت دراسة Looker AC وزملائها عام 2012، أن التخلخل العظمي يزداد والكتلة العظمية تتناقص مع التقدم بالعمر لدى نساء فوق عمر 50 عاماً [118]، وبهذا تخالفت مع دراستنا. وقد يكون سبب الاختلاف بين تأثير العمر على الكثافة العظمية في الفخذ والظهر في دراستنا هو تدخل عوامل أخرى عديدة في التأثير على الحالة العظمية، بالإضافة إلى العمر كعامل اختطار.

3- وجدنا في دراستنا أن التخلخل العظمي وقلة العظم لا ترتبط بدرجة البدانة مقدره بمنسب كتلة الجسم، بينما وجد Rosales-Aujang E وزملاؤه 2014 أن نسبة تخلخل العظام وقلة العظم تزداد بازدياد الوزن [113]. وفي دراسة أجراها Greco E وزملاؤه عام 2010 قسم فيها المرضى بحسب BMI لاحظ أن المجموعة التي تراوحت فيها $BMI > 25$ كانت فيها قيم BMD طبيعية (محايدة)، بينما مجموعة أخرى $BMI > 30$ (بدنين)

ترافقت مع انخفاض الكتلة العظمية وتوافقت بالتالي مع حدوث تخلخل عظام [119]. ظهرت نتائج معاكسة في دراسة Nagi R [116] ودراسة Ravn P وزملائه عام 1999 [120]، الذين وجدوا أن انخفاض BMI يعتبر عامل خطورة لانخفاض الكثافة العظمية وحدث تخلخل عظم. نلاحظ تفاوت الدراسات كثيراً في نتائجها من هذه الناحية ويفسر ذلك بأن البدانة وتخلخل العظام هما مرضان شائعان معقدان لهما مسببات متعددة المصادر من ضمنها الأسباب الجينية والبيئية المحيطة، وعلى فرض أن زيادة الوزن تؤدي لزيادة الحمل الميكانيكي على الجسم وتكون ردة الفعل هي زيادة الكتلة العظمية لدعم الجسم، إلا أن هذا لا يعني أنها ترتبط بالتخلخل العظمي كون البدانة تتبع الكتلة الشحمية في الجسم fat mass بينما وزن الجسم هو عبارة عن الشحوم والبنية العضلية والبنية العظمية.

4- لم نلاحظ في بحثنا هذا وجود علاقة ارتباط يعتقد بها بين قيم DKK-1 والعمر، ولقد توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة Sahar Fathi Ahmed وزميلاتها عام 2013 في جامعة عين شمس بالقاهرة [6]. كذلك لم نجد علاقة ارتباط يعتقد بها بين كل من CTX-1 و OC مع العمر، وبذلك توافقت مع نتائج دراسة Trento LK التي أجريت على 200 امرأة إيطالية عام 2009، حيث لم تجد في دراستها علاقة ارتباط يعتقد بها بين OC و CTX-1 مع العمر. وكذلك لم تجد أي ارتباط بينهما وبين BMI [121]. بينما أظهر Papakitsou وزملاؤه عام 2004 أن BMI يرتبط ارتباطاً عكسياً مع الأوستيوكالسين ($r=0.173$, $P=0.05$) [122]. ولقد أجري قياس الأوستيوكالسين في هذه الدراسة بطريقة مناعية تنافسية (NovoCalcin®, Metra Biosystems, USA) وهي تختلف عن طريقة المقايسة المتبعة في دراستنا. تفسر هذه النتيجة بأن الارتفاع الحاصل في مستويات هذه الواسمات بعد الإياس يرتبط بعوامل أخرى عديدة غير العمر ومنسب كتلة الجسم.

5- أثبتت دراستنا وجود علاقة ارتباط طردية قوية بين كل من DKK-1 و OC و CTX-1 في عينة البحث. أي أن زيادة المستويات المصلية لبروتين DKK-1 تترافق مع زيادة المستويات المصلية للأوستيوكالسين و CTX-1. إن زيادة المستويات المصلية لـ DKK-1 تُعطل تشكل العظم الجديد new bone formation، عبر إنقاص فعالية البانبات العظمية، زيادة إنتاج RANKL وإنقاص إنتاج OPG من الخلايا السدوية الأمر الذي

يؤدي إلى زيادة الارتشاف العظمي [123]. وبالتالي تنقص المستويات المصلية للأوستيوكالسين (واصم البناء العظمي) وتزداد قيم CTX-1 (واصم الارتشاف). ولكن أثبتت العديد من الدراسات أن معدل التقلب العظمي يزداد بسرعة بانخفاض الاستراديول بعد الإياس، حيث تزداد واصمات الارتشاف وواصمات التشكل وتزداد نسبة العظم المُصنع حديثاً والذي يكون أقل تمعدناً وأكثر هشاشية [124،125]. من الممكن أن تعزى زيادة الواصمات في دراستنا لهذا السبب. كذلك قد يكون السبب أن الأوستيوكالسين الحر يزداد في الدوران الدموي لدى النساء بعد الإياس بسبب نقص الكالسيوم وعدم توفره لتشكيل بلورات الهيدروكسي أباتيت مع الأوستيوكالسين فينقص التمعدن ويصبح الأوستيوكالسين أكثر توفراً في الدوران [126]. توافقت نتائج دراستنا في هذا المجال مع نتائج دراسة Bunyaratavej N [127]، ودراسة Jasmina Jovčevska وزملائها عام 2009، ودراسة Al-Daghri NM التي شملت 200 امرأة سعودية [129]، حيث وجدت الدراسات الثلاث السابقة علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين OC و CTX-1.

إن بحثنا هذا هو البحث الأول في بلدنا الذي تناول دراسة العلاقة بين OC و DKK-1 و CTX-1، واستنتاج معادلات الارتباط بينها. وإن وجود علاقة ارتباط طردية قوية يدل على أن DKK-1 يلعب دوراً مهماً في تنظيم تشكّل وارتشاف العظم.

6- لم نجد في بحثنا علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين قيم الأوستيوكالسين والكثافة العظمية. توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة Trento L K [121] السابقة الذكر، نتائج دراسة Chaki O التي أجريت في اليابان عام 2000، شاركت فيها 82 امرأة في المرحلة السابقة للطمث و325 امرأة سليمة بعد انقطاع الطمث [130] ونتائج دراسة Lumachi F وزملائه التي أجراها عام 2009 وتضمنت 84 امرأة بعد سن الإياس مصابات بترقق عظام، قُسمت إلى مجموعتين، مجموعة A أعمار النساء فيها 49-59 والمجموعة B أعمار النساء فيها أكبر من 59، وجد الباحث علاقة ارتباط واضحة بين OC والعمر فقط في المجموعة الثانية مع عدم وجود أي ارتباط بين OC و BMD في هذه المجموعة [131]، مما يدل على أن زيادة OC في المراحل المتقدمة من العمر له علاقة

زيادة معدل التقلب العظمي الذي يعتبر مسؤولاً جزئياً عن تخلخل العظام في هذه المرحلة. تخالفت نتائج دراستنا بالنسبة لارتباط الأوستيوكالسين مع الكثافة العظمية مع نتائج دراسة Junqueira PA وزملائه عام 2002^[32] والتي شملت 82 امرأة تراوحت أعمارهم بين 45-60 عاماً، انقطاع الطمث منذ سنة حتى 10 سنوات، فوجد ارتباطاً سلبياً بين الأوستيوكالسين وBMD في فقرات الظهر وفي مفصل الورك، نلاحظ وجود اختلاف في الحد الأدنى والحد الأعلى للفئات العمرية المشاركة في هذه الدراسة والفئات العمرية المشاركة في دراستنا، كما أخذت هذه الدراسة مدة انقطاع الطمث بعين الاعتبار بينما لم تتطرق دراستنا لمدة انقطاع الطمث عند النساء المشاركات فيها. كما تخالفت دراستنا في هذا المجال مع دراسة Jagtap VR^[26] التي لاحظت ازدياد قيم الأوستيوكالسين الكلي لدى المصابات بتخلخل عظام مقارنة مع المجموعة الشاهدة السليمة. ولكن أجري قياس الكثافة العظمية على عظم الظنوب كما أجري قياس الأوستيوكالسين بطريقة EASIA (solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay). بين Kalaiselvi VS وزملائه عام 2013^[33] في دراسة أجريت على 60 امرأة بعد الإياس، 30 منهن لديهن تخلخل عظام، أن OC يرتبط ارتباطاً سلبياً مع BMD والفارق الإحصائي بين القيم عند المصابات بتخلخل عظام وغير المصابات به هو فارق يعتد به إحصائياً، تراوحت أعمار النساء المشاركة في هذه الدراسة بين 55-65 عاماً وبهذا اختلفت عن أعمار النساء المشاركة في دراستنا، مما قد يفسر اختلاف النتائج بين الدراستين.

- لم نجد في بحثنا علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين قيم CTX-1 والكثافة العظمية. توافقت نتائج دراستنا في هذا المجال مع نتائج دراسة Junqueira PA^[32] ونتائج دراسة Chaki O^[30].

وتخالفت مع نتائج دراسة Jovčevska J^[27] المذكورة سابقاً، والتي بينت أن قيم CTX كانت أعلى وبشكل واضح عند المجموعة المصابة بتخلخل عظام من المجموعة المصابة بقلة عظم والمجموعة الشاهدة السليمة، كما كانت فيها قيم OC عند المصابات بتخلخل عظام أعلى بشكل واضح من المجموعة الشاهدة السليمة ولم يكن الفارق واضحاً بين مجموعتي تخلخل العظام وقلة العظم. أجريت المقاييسات في هذه الدراسة بطريقة ECL-

technology بواسطة جهاز Roche Elecsys/2010 analyzer وهي تختلف عن طريقة المعايرة المتبعة في دراستنا. تخالفت نتائج دراستنا أيضاً مع نتائج دراسة Al-Daghri NM السعودية [29] والتي كانت فيها قيم CTX عند المريضات المصابات بتخلخل عظم أعلى من المجموعة الشاهدة، وقيم الأوستيوكالسين أصغر عند المرضى بفارق معتد به إحصائياً. ولكن عدد النساء المشاركات في هذه الدراسة كان أكبر من عدد النساء في دراستنا وبلغ 200 امرأة، كما أجريت معايرة الواصمين بواسطة جهاز COBAS e 411 Analyzer (Roche Diagnostics)، الذي يعمل بتقنية Electrochemiluminescence (ECL) وهذا ما يمكن أن يفسر اختلاف النتائج بين الدراستين.

7- لم نجد في بحثنا علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين DKK-1 والكثافة العظمية. وكانت هذه النتيجة متوافقة مع نتيجة دراسة Hampson G وزملائها عام 2013 [34]، شملت الدراسة 146 امرأة بعد الإياس في بريطانيا، ولم تجد أي علاقة ارتباط بين DKK-1 وBMD. تخالفت نتائج دراستنا مع دراسة Sahar Fathi Ahmed وزميلاتها [6]، شملت هذه الدراسة 60 امرأة بعد سن الإياس، وقسمت النساء إلى ثلاث مجموعات، مصابات بتخلخل عظام ومصابات بقلة عظم وصحيحات. لوحظ في هذه الدراسة زيادة واضحة في المستويات المصلية لـ DKK-1 عند مجموعة تخلخل العظام ومجموعة قلة العظم مقارنة مع المجموعة الشاهدة. قد يكون سبب الاختلاف بين الدراستين هو اختلاف الفئات العمرية المشاركة في هذه الدراسة والتي بلغت 45-52 عاماً بينما بلغت في دراستنا 43-87 عاماً. ويمكن تفسير عدم الارتباط بين الكثافة العظمية و DKK-1 بأن مرض تخلخل العظام هو مرض استقلابي معقد له مسببات متعددة المصادر من ضمنها الأسباب الجينية والبيئية المحيطة، يتدخل فيه الكثير من عوامل الاختطار ويتأثر كثيراً بالعرق وطبيعة الحياة والمدخول الغذائي. بالإضافة إلى الاكتشاف المتزايد والمستمر لجزيئات جديدة وسبل تنظيمية تتدخل في تنظيم الاستقلاب العظمي، الأمر الذي يدفعنا إلى الاستنتاج بأنه لا يمكن الاعتماد على واصل واحد لتقييم حالة الكتلة العظمية.

5. الاستنتاجات Conclusions

لا يمكن الاعتماد على القيم المصلية لكل من DKK-1 و OC و CTX-1 لتقييم الكثافة العظمية لدى نساء بعد سن الإياس، وبالتالي يبقى التصوير بجهاز مقياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة (DXA) Dual x-ray absorptiometry هو المقياس الذهبي لقياس الكثافة العظمية المعدنية BMD.

إن وجود علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين DKK-1 و OC و CTX-1 يدل على أن DKK-1 يلعب دوراً هاماً في تنظيم التقلب العظمي، حيث يمكن من خلاله استخدام معادلة الارتباط لاستنتاج قيم OC و CTX-1 والحصول على تصور تقريبي عن حالة التقلب العظمي دون الحاجة لمقايسة هذين الواصمين، الأمر الذي يفيد في متابعة التبدلات الديناميكية الصغيرة بالكتلة العظمية والتي لا يمكن تتبعها بواسطة جهاز DXA.

6. التوصيات والمقترحات Suggestions and Recommendations

مقايسة DKK-1 عوضاً عن مقايسة كل من OC و CTX-1 لتقييم حالة التقلب العظمي لدى نساء بعد الإياس.

7. الملخص Summary

الخلفية: تزداد اضطرابات العظم والاستقلاب المعدني كمشاهدة سريرية في العيادات كل يوم، بين المتقدمين في العمر من سكان العالم. وتخلخل العظم بعد الإياس هو واحد من أكثر الحالات النموذجية المرتبطة مع تبدلات في استقلاب العظم. وأقرت منظمة الصحة العالمية كثافة العظم المعدنية كإجراء تشخيص معياري لتخلخل العظم باستخدام مقياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة، غير أن التعرض للأشعة ما يزال مقلقاً بالنسبة لهذا الإجراء ويمنع تكراره بشكل مستمر.

الهدف: إن الهدف من هذه الدراسة هو إثبات إمكانية استخدام DKK-1 وواصمات التقلب العظمي (OC و CTX-1) لتقييم حالة العظم عند نساء بعد الإياس.

المواد والطرق: قيست القيم المصلية لكل من DKK-1 و OC و CTX-1 باستخدام طريقة مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA)، لدى 77 امرأة بعد سن الإياس، اللاتي قسمن اعتماداً على الكثافة العظمية إلى ثلاث مجموعات: سليمات، مصابات بتخلخل عظم ومصابات بقلة عظم، وُعُينت الكثافة العظمية للعمود الفقري وعنق الفخذ بواسطة جهاز مقياس امتصاص الأشعة ثنائي الطاقة Dual x-ray absorptiometry (DXA). قمنا بدراسة الارتباط بين كل من هذه

أجري بزل عينات دموية من نساء بعد الإياس (77 مريضة)، كُنَّ قد خضعن لقياس كثافة عظمية في فقرات الظهر وفي عظم الورك، ثم جرى تنفيل العينات الدموية والحصول على المصل ثم معايرة DKK-1 و OC و CTX-1 بطريقة ELISA. جرت دراسة العلاقة بين كل من DKK-1 و OC و CTX-1 مع العمر، منسب كتلة الجسم والكثافة العظمية المعدنية (في فقرات الظهر وفي مفصل الورك)، كما جرت دراسة علاقة الواصمات الثلاث مع بعضها البعض.

النتائج: لم نجد علاقة ارتباط يعتد بها إحصائياً بين المستويات المصلية لكل من DKK-1 و OC و CTX-1، مع العمر، منسب كتلة الجسم والكثافة العظمية في فقرات الظهر وفي مفصل الورك. وجدنا علاقة ارتباط طردية قوية يعتد بها إحصائياً بين الواصمات الثلاث، وجرى استنتاج معادلات الارتباط بينهم، التي من الممكن أن تكون ذات أهمية مضافة في تقييم الحالة العظمية عند النساء بعد الإياس.

$\{OC = (1.85)DKK\} (R^2 = 0.831)$. $\{CTX = (5.805) OC + 46.983\} (R^2 = 0.838)$. $\{CTX = (12.292)DKK\} (R^2 = 0.912)$.

الاستنتاج: إن مقايسة كل من DKK-1 و OC و CTX-1 ذات قيمة تشخيصية محدودة في تقييم الحالة العظمية عند نساء بعد الإياس.

الكلمات المفتاح: الكثافة المعدنية العظمية، بروتين DKK-1، الأوستيوكالسين، النهاية الكربوكسيلية للبيتيد الانتهائي في الكولاجين نمط 1 و تخلخل العظم التالي للإياس.

Abstract

Background: Between elder population nationwide, disorders of bone and mineral metabolism become increasingly relevant to every day clinical practice. Osteoporosis after menopause is one of the most typical condition associated with changes in bone metabolism . WHO approved bone mineral density as a standard diagnostic procedure for osteoporosis by using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA), however; since the radiation exposure is still a concern, this procedure can not be done very often.

AIM: The aim of this study is to prove that Dickkopf related protein and bone turnover markers (CTX and OC) can be used in the assessment of bone status in women with postmenopausal osteoporosis.

Materials and methods: Serum CTX, OC and DKK-1 were measured, by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), in 77 postmenopausal women, which divided depending on BMD, into three groups: healthy, osteoporotic and osteopenic women. The spine and femur bone mineral density (BMD) were determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). The relative correlation between these markers as an individual item was measured. Furthermore the correlation between these markers and age, body mass index (BMI) and BMD (femoral and vertebral) was analyzed.

Results: No correlation was found between serum levels of OC, CTx-1 and DKK-1 and age, BMI and vertebral or femoral BMD. However a correlation was found among these three proteins

{ $CTX = (5.805) OC + 46.983$ } ($R^2 = 0.831$). { $OC = (1.85)DKK$ } ($R^2 = 0.838$). { $CTX = (12.292)DKK$ } ($R^2 = 0.912$), and that can be helpful in the diagnostic and therapeutic assessment of other metabolic bone disease.

Conclusion: Determination of serum CTX, DKK-1 and OC does not have a clinical value in the evaluation of bone status in menopausal women.

Keywords: bone mineral density, dickkopf related protein-1, osteocalcin, c-terminal telopeptide of type1 collagen, postmenopausal osteoporosis.

Appendix 8. الملحق

References المراجع

- [1] - Datta HK, Ng FW, Walker JA, Tuck SP and Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism-a review. *J Clin Path.* 2008; 61:577-587.
- [2]. Kaplan FS. Osteoporosis. Pathophysiology and prevention. *Clin Symp.* 1987; 39:1-32.
- [3]. Garnero P. The contribution of collagen crosslinks to bone strength. *Bonekey Rep.* 2012; 1: 182.
- [4]. Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, Wagener M et al. Establishing a Reference Interval for Bone Turnover Markers in 637 Healthy, Young, Premenopausal Women From the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *JBMR.* 2009; 24(3):389–397.
- [5]. Garnero P. New biochemical markers of bone turnover. *IBMS BoneKEy.* 2008; 5:84–102.
- [6]. Ahmed SF, Fouda N and Abbas AA . Serum Dickkopf-1 Level in Postmenopausal Females, Correlation with Bone Mineral Density and Serum Biochemical Markers. *Osteoporosis.* 2013; Article ID 460210, 7 pages.
- [7]. Calvo MS, Eyre DR and Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *EndocrRev.* 1996; 17:333–68.
- [8]. Enlow DH. Principles of bone remodeling. *Springfield.* 1963; 50(277):992.
- [9]. http://www.medicallook.com/human_anatomy/organs/Bone_cells.html
- [10]. <http://imueos.wordpress.com/2010/09/29/bone-physiology>.
- [11]. Julie G. Pilitsis , neurosurgical focus, (American association of neurological surgeons) "bone healing and spinal fusion" 2002; 13(6).
- [12]. Dempster DW. Histomorphometric analysis of bone remodeling in "Principles of Bone Biology volume1" , Ed. John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz and T. John Martin , Pub. Academic Press, Sep 29, 2008 ; 450.

- [13]. Carey JJ, Licata AA and Delaney MF. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2006; 4(3):197-212.
- [14]. Martin JT and Smith NA. signaling in bone in "Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications" ; Ed. Markus J. Seibel MJ, Robins SP and Bilezikian JP ; Pub. Academic Press. 2006 : 259-267
- [15]. <http://imueos.wordpress.com/2010/09/29/bone-physiology/>
- [16]. Lian JB, Gravallesse EM and Stein GS. " Osteoblasts and their Signaling Pathways : new frontiers for linkage to the Immune System " in *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems* ; Ed. Lorenzo J, Choi Y, Horowitz M and Takayanagi H; Pub. Academic Press 2011, p : 113
- [17]. Nusse R, Varmus HE. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The EMBO Journal.* 2012; 31: 2670–2684.
- [18] Esen E, Chen J, Karner CM, Okunade AL, et al. WNT-LRP5 Signaling Induces Warburg Effect through mTORC2 Activation during Osteoblast Differentiation. *Cell Metabolism.* 2013; 17(5): 745-755.
- [19]. Boyden L.M., et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:1513–1521
- [20]. Holmen S.L., et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. *J. Bone Miner. Res.* 2004; 19:2033–2040.
- [21]. Plotkin L I and Nicolitta bivi N; "local regulation of bone cell function" in *Basic and Applied Bone Biology* ;Ed. David B. Burr, Matthew R. Allen; Pup.Academic Press, Jun 11, 2013; page:51-53.
- [22]. Kawano Y and Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003; 116: 2627-2634.
-] 23]. Witte F, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S and Stricker S. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *In Gene Expr Patterns.* 2009 Apr; 9(4):215-23
- [24]. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C and Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature.* 1998 Jan 22; 391(6665):357-62.

- [25]. Fedi P, Bafico A, Soria N A, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, Kraus MH and Aaronson S A. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling . *J Biol Chem*. 1999 Jul 2; 274(27):19465-72.
- [26]. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW. Et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*. 1999 Oct 1; 238(2):301-13.
- [27]. Guder C, Pinho S, Nacak TG, Schmidt HA, Hobmayer B, Niehrs C and Holstein TW. An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development*. 2006 Mar; 133(5):901-11. Epub 2006 Feb 1.
- [28]. Brott BK and Sokol SY. Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep; 22(17):6100-10 .
- [29]. Li L, Mao J, Sun L, Liu W and Wu D. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22 ;277(8):5977-81. Epub 2001 Dec 12.
- [30]. Aravind L and Koonin EV. A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkopfs. *Current Biology*. 1998 Jul 2; 8(14):R477-8.
- [31]. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ and Shaughnessy JD Jr. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease . *Blood*. 2009 Jan 15; 113(3):517-25
- [32]. Fedders H, Augustin R and Bosch TC. A Dickkopf- 3-related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan Hydra. *Dev Genes Evol*. 2004 Feb; 214(2):72-80. Epub 2004 Jan 15.
- [33]. Hino K, Satou Y, Yagi K and Satoh N. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGFbeta, Hedgehog and JAK/STAT signaling pathways. *Dev Genes Evol*. 2003 Jun; 213(5-6):264-72. Epub 2003 May 9.
- [34]. Pollard SL and Holland PW. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Current Biology*. 2000 Sep 7; 10(17):1059-6.
- [35]. Luke GN, Castro LF, McLay K, Bird C, Coulson A and Holland PW. Dispersal of NK homeobox gene clusters in amphioxus and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29; 100(9):5292-5. Epub 2003 Apr 18.

- [36]. Cadigan KM and Liu YI . Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci.* 2006 Feb 1; 119(Pt 3):395-402.
- [37]. Tada M, Concha ML and Heisenberg CP. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Jun; 13(3):251-60.
- [38]. Kohn AD and Moon RT . Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 2005 Sep-Oct; 38(3-4):439-46.
- [39]. He X, Semenov M, Tamai K and Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004 Apr; 131(8):1663-77.
- [40]. Ellwanger HK, Saito P, Clément-Lacroix, N, Maltry, J. et al. Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008), pp. 4875–4882.
- [41]. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S and He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol.* 2001 Jun 26; 11(12):951-61.
- [42]. Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC and Krumlauf R. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development.* 2003 Sep; 130(18):4295-305.
- [43]. Gregory CA, Perry AS, Reyes E, Conley A, Gunn WG and Prockop DJ. Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem.* 2005 Jan 21; 280(3):2309-23.
- [44]. Mao B and Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene.* 2003 Jan 2; 302(1-2):179-83.
- [45]. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV and Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004 Sep; 5(9):691-701.
- [46]. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B and Shaughnessy JD Jr. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003; 349(26):2483-94.
- [47]. Politou MC, Heath DJ, Rahemtulla A, Szydlo R, Anagnostopoulos A et al. Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients

with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation. *Int J Cancer*. 2006 Oct 1; 119(7):1728-31.

[48]. Krishnan V, Bryant HU and Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006 May; 116(5):1202-9.

[49]. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H and Cundy T. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001; 107(4):513-23.

[50]. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*. 2002 May 16; 346(20):1513-21.

[51]. Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO and Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol*. 2005 ; 25(12):4946-55.

[52]. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*. 2002 Apr 15; 157(2):303-14. Epub 2002 Apr 15.

[53]. Holmen SL, Giambrenardi TA, Zylstra CR, Buckner-Berghuis BD, Resau JH, Hess JF et al. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res*. 2004; 19(12):2033-40.

[54]. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(6):960-74.

[55]. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*. 2006; (6):934-45.

[56]. MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, Sharma P, Goldstein SA, He X and Hauschka PV. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone*. 2007 Sep; 41(3):331-9. Epub 2007 Jun 5.

[57]. del Barco Barrantes I, Davidson G, Gröne HJ, Westphal H and Niehrs C. Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction. *Genes Dev*. 2003 Sep 15; 17(18):2239-44. Epub 2003 Sep 2.

[58]. Yao GQ, Wu JJ, Troiano N and Insogna K. Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the

anabolic response to intermittent PTH treatment in mice. *J Bone Miner Metab.* 2011 Mar 29; (2):141-8.

[59]. Guo J, Liu M, Yang D, Bouxsein ML, Et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab.* 2010 Feb 3; 11(2):161-71.

[60]. René Rizzoli "Atlas of Postmenopausal Osteoporosis: Third Edition" current medicine group, Oct 25, 2011 page 9.

[61]. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S and Nanjappa P. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood.* 2009; 114(2):371-9.

[62]. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ and Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012; 492(1):1-18.

[63]. Glass DA and Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology.* 2007; 148(6):2630.

[64]. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part 1: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26(4):97-122.

[65]. Hill CS and Wolfert RT. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clin Chem Acta.* 1989; 186:315-20.

[66]. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE and Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989; 69:990-1047.

[67]. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 2003; 425:977-80.

[68]. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J and Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73:1447-51.

[69]. http://www.nature.com/nrendo/journal/v9/n1/fig_tab/nrendo.2012.201_F2.html

[70]. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P and Barattolo R. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol.* 1994; 127:1149–58.

[71]. Ingram RT, Park YK, Clarke BL and Fitzpatrick LA. Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. Possible involvement of osteocalcin in bone remodeling. *J Clin Invest.* 1994; 93:989–97

[72]. Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EF, Mann KG and Riggs BL . Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:741–8.

[73]. Price PA, Williamson MK and Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem.* 1981; 256:12760–6.

[74]. Garnero P1, Grimaux M, Demiaux B, Preaudat C, Seguin P and Delmas PD. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res.* 1992 Dec; 7(12):1389-98.

[75]. Lenora J, Ivaska KK, Obrant KJ and Gerdhem P. Prediction of bone loss using biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 2007; 18:1297–305.

[76]. Chen JT, Hosoda K, Hasumi K, Ogata E and Shiraki M. Serum N-terminal osteocalcin is a good indicator for estimating responders to hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:1784–92.

[77]. Delmas PD, Malaval L, Arlot M, et al. Serum bone-Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone.* 1985; 6:339–41.

[78]. Gorai L, Hosoda K, Taguchi Y, et al. A heterogeneity in serum osteocalcin N-terminal fragments in Paget's disease: Comparison with other biochemical indices in pre- and post-menopause. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (S1):T678.

[79]. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R and Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; pp. 265–78.

[80]. Cairns JR and Price PA. Direct demonstration that the vitamin K-dependent bone Gla protein is incompletely gamma-carboxylated in humans. *J Bone Miner Res.* 1994; 9:1989–97.

[81]. Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TN, Engelke JA, Chappell RJ and Suttie JW. A high phyloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:1055–60.

[82]. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G and Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:5266–70.

[83]. Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell.* 2010; 142:309–319.

[84]. http://www.medscape.com/viewarticle/739198_9

[85]. حسامي، الفاهوم ; استنتباب العظام والتشخيص المخبري للانقلاب العظمي. كلية الصيدلة. جامعة دمشق 2002.

[86]. Garnero P, Vergnaud P and Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem.* 2008; 54(1):188–96.

[87]. عبد الصمد، الفاهوم ; واصمات كيميائية حيوية مفيدة لتحديد التقلب العظمي وتقييم ICTP كواصفة ارتشاق عظمي عند مرضى الفشل الكلوي. رسالة ماجستير، جامعة دمشق كلية الصيدلة 2005.

[88]. Hannon RA, Et al. Comparison of ELISA and direct response device to measure urinary type 1 collagen N-telopeptide NTx in postmenopausal women. *Arth Rheum.* 1999; 42: 290.

[89]. Garnero P . New biochemical markers of bone turnover. *IBMS BoneKEy.* 2008; 5:84-102.

[90]. Garnero P, Cloose P, Sornay-Rendu E, Qvis P and Delmas PD. Type I Collagen Racemization and Isomerization and the Risk of Fracture in Postmenopausal Women: The OFELY Prospective Study. *JBMR.* 2002; 17(5):826-833.

[91]. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nicamhlaobh R, et al. The Type I Collagen Fragments ICTP and CTX Reveal Distinct Enzymatic Pathways of Bone Collagen Degradation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003;18(5):859-867.

- [92]. Tuck S P and Francis R M. Osteoporosis. *Postgrad Med J.* 2002; 78:526-532.
- [93]. <http://www.nras.org.uk/osteoporosis-in-ra>
- [94] International Osteoporosis Foundation. Facts and statistics about osteoporosis and its impact. Available at: <http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html>.
- [95] National Osteoporosis Foundation. Available at: <http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html#factsheet-category-23>.
- [96] .Guglielmi G. Preface. Imaging of osteoporosis. *Radiol Clin North Am.* 2010; 48: xv.
- [97].https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Clinicianresearchers/Outcomes_Instrumentation/Fracture_Risk_Assessment_Tool_%28FRAX%29/
- [98]. Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Lawson N and Hosking DJ. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone: calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone.* 2004; 35(1):312-9.
- [99]. Iwaniec UT, Wronski TJ and Turner RT. Histological analysis of bone. *Methods Mol Biol.* 2008; 447:325-41.
- [100]. Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* (2009) 48 (suppl 4): iv3-iv8.
- [101]. Bessho M, Ohnishi I, Matsuyama J, Matsumoto T, Imai K and Nakamura K. Prediction of strength and strain of the proximal femur by a CT-based finite element method. *J Biomech.* 2007; 40(8):1745-53.
- [102]. James F. Griffith and Harry K. Genant. New Imaging Modalities in Bone. *Curr Rheumatol Rep.* 2011; 13(3):241–250.
- [103]. Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Huysmans MC et al . A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(6):558-66.
- [104]. Damilakis J, Maris TG and Karantanas AH. An update on the assessment of osteoporosis using radiologic techniques. *European Radiology.* 2007; 17(6):1591-1602.

[105]. <http://www.mayoclinic.com/health/bone-density-test/MY00304/DSECTION=results>.

[106]. Kasturi GC1, Cifu DX and Adler RA. A review of osteoporosis: part I. Impact, pathophysiology, diagnosis and unique role of the physiatrist. *PM R*. 2009; 1(3):254-60

[107]. Kanis J. A and Johnell O. Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporosis International*. 2005;16(3): 229-238.

[108]. Majumdar S. Magnetic resonance imaging for osteoporosis. *Skeletal Radiology*. 2008; 37(2):95-9

[109]- Lee KS, Bae SH, Lee SH, Lee J and Lee DR. New Reference Data on Bone Mineral Density and the Prevalence of Osteoporosis in Korean Adults Aged 50 Years or Older: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2010. *J Korean Med Sci*. 2014; 29(11):1514–1522.

[110]- Cui LH, Choi JS, Shin MH, Kweon SS, et al. Prevalence of osteoporosis and reference data for lumbar spine and hip bone mineral density in a Korean population. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26:609–617.

[111]- Cheng XG, Yang DZ, Zhou Q, Zhuo TJ, et al. Age-related bone mineral density, bone loss rate, prevalence of osteoporosis, and reference database of women at multiple centers in China. *J Clin Densitom*. 2007 Jul-Sep;10(3):276-84.

[112]- Aghaei M, Reza Bazr Afshan H, Qorbani M, Shadpour Dashti H, and Safari R. Bone mineral density in Iranian patients: Effects of age, sex, and body mass index. *Open Journal of Preventive Medicine*. 2013;3(1):128-131.

[113]- Rosales-Aujang E, Muñoz-Enciso JM and Arias-Ulloa R. Prevalence of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal women and its relation to risk factors. *Ginecol Obstet Mex*. 2014 Apr;82(4):223-8.

[114]- Waugh EJ, Lam MA, Hawker GA, McGowan J et al. Risk factors for low bone mass in healthy 40-60 year old women: a systematic review of the literature. *Osteoporos Int*. 2009 Jan;20(1):1-21.

[115]- Nilas L and Christiansen C. Bone mass and its relationship to age and the menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Oct;65(4):697-702

- [116]- Ravleen Nagi et al . Relationship Between Femur Bone Mineral Density, Body Mass Index and Dental Panoramic Mandibular Cortical Width in Diagnosis of Elderly Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(8): ZC36–ZC40.
- [117]- Boskey AL and Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res.* 2010 Dec;89(12):1333-48.
- [118]- Looker AC, Borrud LG, Dawson-Hughes B, Shepherd JA and Wright NC. Osteoporosis or low bone mass at the femur neck or lumbar spine in older adults: United States, 2005-2008. NCHS Data Brief. 2012 Apr;(93):1-8.
- [119]- Greco E. A, Fornari R, Rossi F, Santiemma V, et al. Is obesity protective for osteoporosis? Evaluation of bone mineral density in individuals with high body mass index. *International Journal of Clinical Practice.* 2010; 64(6): 817–820.
- [120]- Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res.* 1999;14(9):1622-7.
- [121]- Trento L K, Pietropolli A, Ticconi C, Enrica Gravotta¹, De Martino M U, et al. Role of type I collagen C telopeptide, bone-specific alkaline phosphatase and osteocalcin in the assessment of bone status in postmenopausal women. *J Obstet Gynaecol. Res.* 2009; 35(1): 152–159.
- [122]- Papakitsou EF, Margioris AN, Dretakis KE, Trovas G, et al. Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004; 47(3):185–193.
- [123]- Lukaszewicz J, Karczarewicz E, Płodowski P, Jaworski M, et al. Feasibility of simultaneous measurement of bone formation and bone resorption markers to assess bone turnover rate in postmenopausal women: an EPOLOS study. *Med Sci Monit.* 2008;14(12):65-70.
- [124]- Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone.* 2004;34:783–789.
- [125] -Garnero P and Delmas PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic

fracture in postmenopausal women. *J Musculoskel Neuron Interact* . 2004; 4(1):50-63.

[126]- Jagtap VR, Ganu JV, and Nagane NS. BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women. *Indian J Clin Biochem*. 2011 Jan; 26(1): 70–73.

[127] -Jovčevska J, Stratrova S, Gjorgovski I, Gruev T. et al. Bone Turnover Markers Relations to Postmenopausal Osteoporosis. *JMB*. 2009;28: 161–165.

[128] -Bunyaratavej N, Kitimanon N and Boonthitikul S. Study of the level of biochemical bone markers: NMID osteocalcin and bone resorptive marker (beta CTx) in Thai women. *J Med Assoc Thai*. 2001; 84 Suppl 2:S560-5.

[129] -Al-Daghri NM , Yakout S, Al-Shehri E, Al-Fawaz HA, Aljohani N and Al-Saleh Y. Inflammatory and bone turnover markers in relation to PTH and vitamin D status among saudi postmenopausal women with and without osteoporosis. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(10): 3528–3535.

[130] -Chaki O, Yoshikata I, Kikuchi R, Nakayama M, et al. The predictive value of biochemical markers of bone turnover for bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 2000 Aug; 15(8):1537-44.

[131]- Lumachi F, Ermani M, Camozzi V, Tombolan V and Luisetto G. Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173 Suppl 1:E60-3.

[132]- Junqueira PA, da Fonseca AM, Bagnoli VR, et al. Comparison of bone remodeling indicators in climacteric women. *Int J Fertil Womens Med*. 2002; 47:174–81.

[133]- Kalaiselvi VS, Prabhu K, Ramesh M and Venkatesan V. The Association of Serum Osteocalcin with the Bone Mineral Density in Post Menopausal Women. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7(5):814–816.

[134]- Hampson G, Edwards S, Conroy S, Blake G M, et al. The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (Dickkopf-1(DKK1) and sclerostin), bone mineral density, vascular calcification and arterial stiffness in post-menopausal women. *Bone*. 2013; 56(1). 42-47.