



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

Διερεύνηση ασκησιογενών μεταβολών της οστεοκαλσίνης σε υγιείς εθελοντές



Μαριάννα Παγανού,
Αθήνα ,2019

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Τέντα Ρωξάνη (επιβλέπουσα)

**Επίκουρη καθηγήτρια, Φυσιολογία του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο**

Γιαννακούρης Νικόλαος

**Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Αναστάσιος Φιλίππου

Επίκουρος Καθηγητής, Πειραματική Φυσιολογία, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Η Μαριάννα Παγανού δηλώνει υπεύθυνα ότι:

**1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής
εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε
προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.**

**2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της
εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή
Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε
μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους
συντήρησης και ασφάλειας.**

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Οστό	8
1.1.1 Φυσιολογία των οστών	9
1.1.2 Οστεοβλάστες	10
1.1.3 Οστεοκλάστες	13
1.1.4 Οστεοκύτταρα	13
1.2 Μεταβολισμός των οστών	14
1.2.1 Οστική παραγωγή και ρύθμισή της	14
1.2.2 Οστική πυκνότητα	15
1.2.3 Οστεοπόρωση	15
1.3 Ασκησιογενείς προσαρμογές των οστών	16
1.3.1 Η επίδραση της φυσικής δραστηριότητας και της ακινητοποίησης στα οστά	16
1.3.2 Εξειδίκευση της επιβάρυνσης	17
1.3.3 Η μηχανική επιβάρυνση	18
1.4 Μεταβολικά νοσήματα οστών	18
1.4.1 Οστεοσάρκωμα	18
1.4.2 Χονδροσάρκωμα	19
1.4.3 Σάρκωμα του Ewing	19
1.4.4 Νόσος Paget	19
1.5 Βιοχημικοί δείκτες οστικής απορρόφησης και παραγωγής	20
1.5.1 Αλκαλική φωσφατάση	20
1.5.2 Οστεοποντίνη	20
1.5.3 Προκολλαγόνο τύπου I	21
1.5.4 Οστεονεκτίνη	21
1.5.5 Υδροξυπρολίνη ούρων	21
1.5.6 Γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ	22
1.6 Οστεοκαλσίνη	22
1.6.1 Ενεργοποίηση οστεοκαλσίνης	23

1.6.2 Δομικές και μεταμεταφραστικές μετατροπές της οστεοκαλσίνης	25
1.6.3 Ο ρόλος της οστεοκαλσίνης στην επιμετάλλωση	27
1.7 Σωματική άσκηση	30
1.7.1 Τα οφέλη της άσκησης στην υγεία	30
1.7.2 Άσκηση και νευρομυϊκό σύστημα	30
1.7.3 Άσκηση και ενδοκρινικό σύστημα	31
1.7.4 Άσκηση και καρδιαγγειακό σύστημα	31
1.7.5 Άσκηση και ψυχική υγεία	32
1.7.6 Άσκηση με αντιστάσεις	32
1.7.7 Άσκηση και οστικός μεταβολισμός	33
1.8 Οστεοκαλσίνη και μυϊκό σύστημα	34
1.9 Ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης από την οστεοκαλσίνη	36
1.10 Ρόλος της οστεοκαλσίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης	37
1.11 Η οστεοκαλσίνη στη γονιμότητα και τη νόσηση	40
1.12 Gprc6a: ένας υποδοχέας οστεοκαλσίνης	42
1.13 Προσαρμογή στην άσκηση	43
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	46
2.1 Δοκιμαζόμενοι	46
2.2 Πειραματική διαδικασία	46
2.3 Μετρήσεις	48
2.3.1 Φορτίο των 10 μέγιστων επαναλήψεων (RM)	48
2.3.2 Μηχανικές παράμετροι	48
2.3.3 Ανάλυση αίματος	49
2.3.3.1 Αναλύσεις με τη μέθοδο ELISA	49
2.3.3.2 Διαδικασία της μεθόδου ELISA για τον προσδιορισμό της Οστεοκαλσίνης	49
2.4 Στατιστική ανάλυση	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

Περίληψη

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός μεταβολών της οστεοκαλσίνης σε νέους, υγιείς και εξοικειωμένους στις ασκήσεις με αντιστάσεις άνδρες, μετά από προπόνηση ασκήσεων με αντιστάσεις στους εκτείνοντες μυς των κάτω άκρων, με μέγιστη ταχύτητα κίνησης και στο 70% της μέγιστης ταχύτητας κίνησης κατά την εκτέλεση σύγκεντρης συστολής.

Μεθοδολογία: Εννέα υγιείς και σωματικά δραστήριοι άνδρες, υποβλήθηκαν σε ένα πρωτόκολλο ασκήσεων με αντιστάσεις. Συγκεκριμένα, όλοι οι δοκιμαζόμενοι εκτέλεσαν 4 σετ καθίσματα και 4 σετ πιέσεις πρέσας, με φορτίο αυτό των 10 μέγιστων επαναλήψεων το κάθε σετ και 3' διάλειμμα μεταξύ των σετ. Το πρώτο πρωτόκολλο περιλάμβανε την εκτέλεση 8 επαναλήψεων ανά σετ με μέγιστη ταχύτητα κίνησης (V_{max}), ενώ το δεύτερο εμπεριείχε τις ίδιες ασκήσεις και σετ στο 70% της μέγιστης ταχύτητας κίνησης ($70\%V_{max}$). Έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος από τα οποία απομονώθηκαν ορός και πλάσμα. Για την μέτρηση των συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA. Για τη στατιστική ανάλυση των τιμών της οστεοκαλσίνης έγινε η χρήση της μεθόδου ANOVA (δύο παράγοντες, πρωτόκολλο/ώρα από άσκηση - LSD - Tukey).

Αποτελέσματα: Στα δείγματα των εθελοντών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης συγκέντρωσης της οστεοκαλσίνης και ποσοστιαία (μεταβολή %) αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου της V_{max} αλλά και 40 λεπτά μετά. Ακόμη παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στη μέση συγκέντρωση της οστεοκαλσίνης και ποσοστιαία (μεταβολή %) αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου της 70% V_{max} αλλά και 40 λεπτά μετά. Όσον αφορά τις ποσοστιαίες μεταβολές συγκέντρωσης οστεοκαλσίνης παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ώρα από άσκηση και ταχύτητα άσκησης. Τα δεδομένα που προήλθαν από την σύγκριση μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης διαφορετικής χρονικής στιγμής δε δείχνουν συσχέτιση μεταξύ της στιγμής πριν και μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ($p>0.05$).

Συμπεράσματα: Η προπόνηση με αντιστάσεις με μέγιστη ταχύτητα κίνησης φαίνεται να προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση της οστεοκαλσίνης αμέσως μετά τη λήξη της άσκησης, ωστόσο μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα δοκιμαζομένων και διαφορετικά

πρωτόκολλα άσκησης αναμένεται να αποσαφηνίσουν το ρόλο της οστεοκαλσίνης στη φυσιολογία της άσκησης.

Λέξεις – κλειδιά: οστεοκαλσίνη, ασκήσεις με αντιστάσεις

Abstract

Purpose: The aim of the present study is to determine changes in osteocalcin levels in the blood of young, healthy and familiar to resistance exercises men, after training exercises with resistances in the leg limbs, at maximum velocity and at 70% of the maximum velocity during the execution of a concurrent contraction.

Methodology: Nine healthy and physically active men underwent a protocol of resistance exercises. Specifically, all the tested persons performed 4 sets of seats and 4 sets of press pressures, with a load of 10 times the maximum of each set and 3' between the sets. The first protocol involved the execution of 8 repetitions per set with maximum motion velocity (V_{max}), while the second included the same exercises and sets at 70% of the maximum velocity (70% V_{max}). Blood samples were collected from which serum and plasma were isolated. The ELISA method was used to measure osteocalcin concentrations. For the statistical analysis of osteocalcin values, the ANOVA method (two factors, protocol / hour of exercise - LSD - Tukey) was used.

Results: The samples showed a statistically significant increase in mean osteocalcin concentration and % change immediately after the V_{max} protocol and 40 minutes later. Still, statistically significant reductions in mean osteocalcin concentration and % change were observed immediately after the 70% V_{max} protocol and 40 minutes later. In terms of percentage changes in osteocalcin concentration, interaction between time after exercise and velocity was observed. Data derived from the comparison between osteocalcin concentration values at different time points did not show a correlation between the time before and after the protocol was performed ($p > 0.05$).

Conclusions: Workout with resistance at maximum velocity seems to cause an increase in osteocalcin concentration immediately after exercise, but studies with a larger sample of tested and different exercise protocols are expected to clarify the role of osteocalcin in the physiology of exercise.

Key words: osteocalcin, resistance exercises

1.Εισαγωγή

1.1 Οστό

Το οστό είναι ένας επιμεταλλωμένος συνδετικός ιστός που εμφανίζει τέσσερις τύπους κυττάρων: οστεοβλάστες, γραμμικά κύτταρα οστών, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες (Buckwalter *et al.*, 1996, Downey and Siegel, 2006) . Το οστό εξυπηρετεί σημαντικές λειτουργίες στο σώμα, όπως η μετακίνηση, η υποστήριξη και η προστασία των μαλακών ιστών, η αποθήκευση ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων και η συγκράτηση του μυελού των οστών (Robling, 2006, Datta *et al.*, 2008). Παρά την αδρανή εμφάνισή του, το οστό είναι ένα εξαιρετικά δυναμικό όργανο που απορροφάται συνεχώς από οστεοκλάστες και νεομορφοποιείται από τους οστεοβλάστες. Υπάρχουν αποδείξεις ότι τα οστεοκύτταρα δρουν ως μηχανικοί αισθητήρες και διαχειριστές αυτής της διαδικασίας αναμόρφωσης οστού (Clarke, 2008, Bonewald, 2011, Karsenty *et al.*, 2009, Teitelbaum, 2007) . Η λειτουργία των κυττάρων επένδυσης των οστών δεν είναι αρκετά σαφής, αλλά αυτά τα κύτταρα φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύζευξη της επαναρρόφησης των οστών στο σχηματισμό των οστών (Everts *et al.*, 2002).

Η αναδιαμόρφωση των οστών είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία με την οποία το παλιό οστό αντικαθίσταται από νέο οστό σε έναν κύκλο που αποτελείται από τρεις φάσεις: (1) έναρξη επαναρρόφησης οστού από οστεοκλάστες, (2) μεταβατική (ή περίοδος αναστροφής) από επαναρρόφηση σε νέο οστό σχηματισμό και (3) ο σχηματισμός οστού από οστεοβλάστες (Sims and Gooi, 2008, Matsuo and Irie, 2008). Αυτή η διαδικασία συμβαίνει λόγω των συντονισμένων δράσεων των οστεοκλαστών, των οστεοβλαστών, των οστεοκυττάρων και των επενδυτικών κυττάρων των οστών που σχηματίζουν την προσωρινή ανατομική δομή που ονομάζεται βασική πολυκυτταρική μονάδα (BMU) (Frost, 1969, Andersen *et al.*, 2009, Hauge *et al.*, 2001).

Η κανονική αναμόρφωση του οστού είναι απαραίτητη για την επούλωση κατάγματος και την προσαρμογή του σκελετού στη μηχανική χρήση, καθώς και για την ομοιόσταση του ασβεστίου (Dallas *et al.*, 2013). Από την άλλη πλευρά, μια ανισορροπία της οστικής απορρόφησης και σχηματισμού έχει ως αποτέλεσμα πολλές ασθένειες των οστών. Για παράδειγμα, η υπερβολική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες χωρίς την αντίστοιχη παραγωγή οστού από τους οστεοβλάστες συμβάλλει στην απώλεια οστού και

στην οστεοπόρωση (Khosla *et al.*, 2012) ενώ το αντίθετο μπορεί να οδηγήσει σε οστεοπέτρωση (Sobacchi *et al.*, 2013). Έτσι, η ισορροπία μεταξύ σχηματισμού οστού και επαναρρόφησης είναι απαραίτητη και εξαρτάται από τη δράση αρκετών τοπικών και συστημικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των ορμονών, των κυτταροκινών, των χημειοκινών και της βιολογικής διέγερσης (Raisz and Rodan, 1998, Crockett *et al.*, 2011, Phan *et al.*, 2004) .

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα οστά επηρεάζουν τη δραστηριότητα άλλων οργάνων και το οστό επηρεάζεται επίσης από άλλα όργανα και συστήματα του σώματος (Fukumoto and Martin, 2009) παρέχοντας νέες ιδέες και αποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα και τη δυναμική φύση του οστικού ιστού.

1.1.1 Φυσιολογία των οστών

Το οστό είναι ένας δυναμικός ιστός που συνεχώς αναδιομορφώνει έναν υγιή σκελετό ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική και δια βίου εκτέλεση σημαντικών σκελετικών λειτουργιών. (Feng and Mcdonald , 2011) Η δομή των οστών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως κληρονομικότητα, ασθένειες, διατροφή, ορμονικές και άλλες διαταραχές της εύρυθμης μηχανικής λειτουργίας του σώματος. Η επικρατέστερη άποψη σχετικά με την ανάπτυξη των οστών είναι αυτή του γερμανού Wolff (1892) σύμφωνα με την οποία οι μηχανικές δυνάμεις που επιδρούν στα οστά, είναι ικανές να μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική τους δομή. (Jacob and Francone, 1966)

Ο οστίτης ιστός είναι ένας ζωτικός και δυναμικός ιστός. Τα οστά είναι σχεδιασμένα ώστε να εκτελούν τις εξής σημαντικές λειτουργίες. Η πρώτη εξασφαλίζει τη στήριξη και την κινητικότητα του ατόμου και είναι συνεργική με τα άλλα στοιχεία του μυοσκελετικού συστήματος. Η δεύτερη είναι η προστασία που παρέχει στο αιμοποιητικό σύστημα και στα ζωτικά όργανα του κρανίου, του θώρακα και της πύελου και η τρίτη είναι η ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου, του μαγνησίου και του φωσφόρου. Τα οστά έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την γεωμετρία τους και να προσαρμόζονται σε νέα δεδομένα όπως είναι η οστική απώλεια ή η μεταβολή της μυϊκής μάζας σε περιόδους όπως είναι της σκελετικής ανάπτυξης. Ακόμα έχουν την ικανότητα της συνεχούς επιδιόρθωσης των μικροφθορών με τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής αλλά και της πλήρους αποκατάστασης όπως συμβαίνει στα κατάγματα (Guyton *et al.*, 1988). Ο οστίτης ιστός ορίζεται ως ένας τύπος πυκνού συνδετικού ιστού ο οποίος σχηματίζεται από την

ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία και από τα τρία είδη κυττάρων : τα οστεοκύτταρα, τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες. (Φουσέκης κ.α., 2015).

1.1.2 Οστεοβλάστες

Τα κύτταρα του οστικού ιστού, τα οποία ονομάζονται οστεοβλάστες, μεταναστεύουν στην επιφάνεια των οστών η οποία υποβάλλεται σε μηχανική επιβάρυνση και ξεκινούν τη διαδικασία δημιουργίας νέου οστού. Είναι οστεοπαραγωγικά κύτταρα τα οποία είναι μικρά μονοπύρρηνα κυβοειδή κύτταρα και προέρχονται από τα πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού. Οι οστεοβλάστες προέρχονται από μεσεγχυματογενή κύτταρα τα οποία είναι αρχικά πολυδύναμα και τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μύες, λιποκύτταρα, χόνδρο ή ινώδη συνδετικό ιστό. Οι οστεοβλάστες αποτελούν τα κύτταρα που επενδύουν εσωτερικά στο οστό και είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των συστατικών της θεμέλιας ουσίας, του κολλαγόνου και των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Φαίνεται ότι υπάρχει ένας υποπληθυσμός πρόδρομων κυττάρων τα οποία έχουν μερικώς διαφοροποιηθεί και μπορούν να εξελιχθούν σε οστεοβλάστες. Αυτά τα “δεσμευμένα προγονικά οστεοβλαστικά κύτταρα” είναι παρόντα στο περίοστεο και στο μυελικό στρώμα *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν επίσης να εξελιχθούν σε λιποκύτταρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και ότι αυτός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός ελαττωματικού οστικού σχηματισμού κατά τη γήρανση (Allan *et al.*, 2003). Οι οστεοβλάστες είναι λειτουργικά και μορφολογικά ετερογενείς (Liu *et al.*, 1997). Κατά τη διάρκεια των σύντομων φάσεων του οστικού σχηματισμού μπορεί να είναι κυλινδρικοί σε σχήμα, με άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο και να συνθέτουν κολλαγόνο ταχύτατα. Οι οστεοβλάστες έχουν επίσης υποδοχείς για παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την οστική αναδιαμόρφωση και παράγουν πολλούς ρυθμιστές της οστικής ανάπτυξης. Οι οστεοβλάστες είναι τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα του οστίτη ιστού, υπεύθυνα για τον σχηματισμό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη ρύθμιση της απόθεσης των ανόργανων συστατικών. Μια πληθώρα κυτταρικών υποδοχέων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν ανιχνευθεί στην κυτταρική μεμβράνη των οστεοβλαστών με σκοπό την επικοινωνία με τα υπόλοιπα κύτταρα του οστίτη ιστού και την θεμέλια ουσία καθώς και την απόκριση σε μεταβολικά και μηχανικά ερεθίσματα. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν άφθονη πυροφωσφορική υδρολάση και αλκαλική φωσφατάση, καθώς επίσης, υποδοχείς για την παραθορμόνη, τα οιστρογόνα και την 1.25 διυδροξυ-βιταμίνη D3. Επιπροσθέτως, κατά την διάρκεια που σχηματίζονται στρώματα οστίτη ιστού, μερικοί οστεοβλάστες

εγκλωβίζονται στο οστεοειδές και στη συνέχεια μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα (Sommerfeldt. *et al.*, 2001).

Οι οστεοβλάστες είναι κυβοειδή κύτταρα που βρίσκονται κατά μήκος της οστικής επιφάνειας και περιλαμβάνουν το 4-6% των ολικών οστικών κυττάρων και είναι γνωστά για τη λειτουργία σχηματισμού οστού (Capulli *et al.*, 2014). Αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων συνθέσεως πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του άφθονου αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi, καθώς και διαφόρων εκκριτικών κυστιδίων (Capulli *et al.*, 2014, Marks and Popoff, 1988). Ως πολωμένα κύτταρα, οι οστεοβλάστες εκκρίνουν το οστεοειδές. (Damoulis and Hauschka, 1997) (Σχήματα 1 (α), 1 (b) και 2 (α)).

Η σύνθεση του οστικού πλέγματος συμβαίνει σε δύο κύρια στάδια: απόθεση οργανικού πλέγματος και επακόλουθη επιμετάλλωση [Σχήματα 1 (b) -1 (d)]. Στο πρώτο βήμα, οι οστεοβλάστες εκκρίνουν πρωτεΐνες κολλαγόνου, κυρίως κολλαγόνο τύπου I, πρωτεΐνες μη κολλαγόνου (OCN, οστεονεκτίνη, BSP II και οστεοποντίνη) και πρωτεογλυκάνη συμπεριλαμβανομένης της ντεκορίνης και της biglycan, οι οποίες σχηματίζουν το οργανικό πλέγμα. Λόγω του αρνητικού φορτίου, οι θειωμένες πρωτεογλυκάνες ακινητοποιούν τα ιόντα ασβεστίου που αποθηκεύονται μέσα στο οστικό πλέγμα (Yoshiko *et al.*, 2007, Arana-Chavez, 1995). Όταν οι οστεοβλάστες εκκρίνουν ένζυμα που αποικοδομούν τις πρωτεογλυκάνες, τα ιόντα ασβεστίου απελευθερώνονται από τις πρωτεογλυκάνες και διασχίζουν τους διαύλους ασβεστίου που παρουσιάζονται στη μεμβράνη των κυστιδίων του πλέγματος (Anderson, 2003).

Οι ενώσεις που περιέχουν φωσφορικό άλας αποικοδομούνται από την αλκαλική φωσφατάση που εκκρίνεται από οστεοβλάστες, απελευθερώνοντας φωσφορικά ιόντα μέσα στο οστικό πλέγμα. Στη συνέχεια, τα φωσφορικά ιόντα ασβεστίου μέσα στα κυστίδια αντιδρούν, σχηματίζοντας τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (Glimcher, 1998).

Οι ώριμοι οστεοβλάστες εμφανίζονται ως ένα μονό στρώμα κυβοειδών κυττάρων που περιέχουν άφθονο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μεγάλο σύμπλεγμα Golgi [Σχήματα 2 (α) και 3 (α)]. Σε αυτό το στάδιο, οι ώριμοι οστεοβλάστες μπορούν να υποβληθούν σε απόπτωση ή να γίνουν οστεοκύτταρα ή επενδυτικά κύτταρα (Feron *et al.* 2010, Parfitt 1990, Jilka *et al.*, 1998). Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκαν στρογγυλές / ωοειδείς δομές που περιέχουν πυκνά σώματα και δομές με σύραγγες μέσα σε κενοτοπικούς οστεοβλάστες. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι εκτός από φαγοκύτταρα, οι

οστεοβλάστες είναι επίσης ικανοί να κατακλύζουν και να αποικοδομούν αποπτωτικά σώματα κατά τη διάρκεια σχηματισμού κυψελιδικών οστών (Cerrì, 2005).

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC). Η διαφοροποίηση των MSC σε οστεοπαραγωγά κύτταρα απαιτεί την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ακολουθώντας έγκαιρα προγραμματισμένα βήματα, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης μορφογενετικών πρωτεϊνών οστών (BMPs) και μελών των οδών Wntless (Wnt) (Grigoriadis *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα, το Runx2 είναι κύριο γονίδιο διαφοροποίησης οστεοβλαστών, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι Runx2-null ποντικοί στερούνται οστεοβλαστών (Ducy *et al.*, 1997, Komori *et al.*, 1997). Το Runx2 φαίνεται επίσης ότι επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με οστεοβλάστες όπως τα Col1A1, ALP, BSP, BGLAP και OCN (Fakhry *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, η μετάπτωση των προοστεοβλαστών σε ώριμους οστεοβλάστες χαρακτηρίζεται από αύξηση της έκφρασης του Osx και από την έκκριση πρωτεϊνών οστικού πλέγματος όπως οστεοκαλσίνη (OCN), σιαλοπρωτεΐνη οστών (BSP) I / II και κολλαγόνο τύπου I. Επιπλέον, οι οστεοβλάστες υποβάλλονται σε μορφολογικές αλλαγές, δηλαδή μεταπίπτουν σε μεγάλα και κυβοειδή κύτταρα (Ducy *et al.*, Nakashima *et al.*, 2002, Glass *et al.*, 2005, Hu *et al.*, 2005).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι άλλοι παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), τα microRNAs και η συνδεξίνη 43 παίζουν σημαντικούς ρόλους στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Kapinas *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2011, Montero *et al.*, 2000, Buo and Stains, 2014). Οι ποντικοί με εξουδετέρωση FGF-2 έδειξαν μια μειωμένη οστική μάζα συζευγμένη με την αύξηση των λιποκυττάρων στον μυελό των οστών, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή των FGF στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Montero *et al.*, 2000). Έχει επίσηςδειχθεί ότι ο FGF-18 αυξάνει την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών με έναν αυτοκρινή μηχανισμό (Hamidouche, 2010). Τα microRNA εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των οστεοβλαστών, στους οποίους ορισμένα microRNA διεγείρουν και άλλα αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Hassan *et al.*, 2012, Tome *et al.*, 2011). Η Connexin 43 είναι γνωστό ότι αποτελεί τη βασική συνδεξίνη στα οστά. Η μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνδεξίνη 43 υποβαθμίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και προκαλεί σκελετικές δυσπλασίες στον ποντικό (Flenniken *et al.*, 2005).

1.1.3 Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα κύτταρα που συναντώνται στις οστικές επιφάνειες, έχουν ακανόνιστο σχήμα και ειδικεύονται στην απορρόφηση του οστίτη ιστού. (Χατζηπαύλου και Κοντάκης, 2006) Η σημασία τους εντοπίζεται στην αποδόμηση του οστίτη ιστού μέσω της απελευθέρωσης οξέων και πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι οστεοκλάστες είναι τα μόνα κύτταρα που έχουν απορροφητικές οστικές ιδιότητες. Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα τα οποία απορροφούν οστούν διαλύοντας τα ανόργανα συστατικά (άλατα) και αποδομώντας το οστεοειδές. Οι ενεργοί οστεοκλάστες διαθέτουν συνήθως 2-5 πυρήνες ή και περισσότερους. Έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, πολλαπλά συστήματα Golgi και πολλά μιτοχόνδρια. Οι οστεοκλάστες συχνά ανευρίσκονται σε ομάδες, είτε στην οστική επιφάνεια όπου δημιουργούν τα βοθρία του Howship είτε βαθύτερα. Οι οστεοκλάστες είναι κύτταρα υψηλής εξειδίκευσης εντοπισμένα στις ενδοοστικές επιφάνειες του οστού, υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση. Προσκολλώνται σε σημεία του οστού τα οποία ανακατασκευάζονται και απορροφούν ασβεστοποιημένο ιστό. Η επιφάνεια των οστεοκλαστών είναι έντονα κροσσωτή καθώς παρουσιάζουν κυτταρική πόλωση. Προσφύονται στερεά στην οστική επιφάνεια σχηματίζοντας έτσι μια κλειστή κοιλότητα. Η «πτυχωτή» αυτή παρυφή αποτελεί την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του οστεοκλάστη που βρίσκεται σε στενή επαφή με την προς απορρόφηση οστική επιφάνεια. (Am J Med Genet A, 2006)

1.1.4 Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα είναι προϊόν παραγωγής των οστεοβλαστών και εντοπίζονται σε μικρές κοιλότητες μέσα στη θεμέλια ουσία. Ο κύριος ρόλος τους είναι ο έλεγχος της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου και του φωσφόρου αλλά και η συντήρηση της θεμέλιας ουσίας του οστού και η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου όταν απαιτείται (Χατζηπαύλου και Κοντάκης, 2006). Τα οστεοκύτταρα, η πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων του οστίτη ιστού, αποτελούν προϊόντα διαφοροποίησης των ώριμων οστεοβλαστών και βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες ή κυψελίδες των πεταλίων του οστού, έχοντας εγκλωβιστεί εκεί κατά την διάρκεια επιμετάλλωσης της θεμέλιας ουσίας του οστού. Έτσι, με τον εγκλεισμό τους στην θεμέλια ουσία σταματούν να πολλαπλασιάζονται

και μέσω των χασματοσυνδέσεων σχηματίζουν δίκτυα επικοινωνίας με τους οστεοβλάστες, μεταβιβάζοντας σε αυτούς τα σήματα από τα μηχανικά φορτία που ασκούνται στην επιφάνεια του οστού (Takayagi *et al.*, 1999). Παρουσιάζουν αστεροειδή δομή με δενδριτικές προσεκβολές του πρωτοπλάσματός τους, επικοινωνώντας με τον τρόπο αυτό με τα παρακείμενα οστεοκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα των οστικών επιφανειών μέσα από σωληνίσκους (Bonewald L. *et al.*, 2006). Παράλληλα, τα οστεοκύτταρα επικοινωνούν τόσο μεταξύ τους όσο και με οστεοβλάστες και οστεοκλάστες μεταφέροντας θρεπτικά συστατικά και ερεθίσματα από το ένα κύτταρο στο άλλο. Το εκτεταμένο αυτό δίκτυο επικοινωνίας είναι υπεύθυνο για την μεταβίβαση σημάτων για τις φορτίσεις που υφίστανται τα οστά, καθώς και την ενεργοποίηση της οστικής ανακατασκευής. Τα οστεοκύτταρα έχουν την ικανότητα μηχανοϋποδοχέων και μπορούν να αντιλαμβάνονται μηχανικές φορτίσεις, να ενεργοποιούνται από τις πιέσεις του υγρού των μικροσωληνίσκων και να τις μεταφράζουν σε βιοχημικά σήματα (Takayagi *et al.*, 1999).

1.2 Μεταβολισμός των οστών

1.2.1 Οστική παραγωγή και ρύθμισή της

Η παραγωγή οστού αποτελεί μια δυναμική λειτουργία του οστίτη ιστού, τόσο στη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης όσο και κατά την πόρωση των καταγμάτων. Η οστική κατασκευή ρυθμίζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες αλλά και από ενδοκρινικούς και άλλους παράγοντες. Η οστική ανακατασκευή ρυθμίζεται, εκτός από γενετικούς, και από συστηματικούς παράγοντες (πχ. παραθορμόνη, βιταμίνη D, καλσιτονίνη κ.α.), καθώς επίσης και από τοπικούς παράγοντες. Οι τοπικοί οστικοί μηχανισμοί ενεργούν κυρίως με τη μεσολάβηση των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών, ουσιών που δρουν αυτοκρινικά. Οι κυτταροκίνες παρουσιάζουν πολλαπλά επίπεδα δράσης στα οστά. Εμπλέκονται στις διαδικασίες διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται οι οστεοκλάστες και οι οστεοβλάστες, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να επιδράσουν και σε ώριμα κύτταρα ελέγχοντας έτσι την ισορροπία αυτών των πληθυσμών. Αλληλεπιδρούν ακόμα με τα ορμονικά συστήματα που ρυθμίζουν τον οστικό μεταβολισμό (άξονας υποθαλάμου - υπόφυσης, ορμόνες φύλου και βιταμίνη D) και συμπεριλαμβάνονται στους τελικούς διαβιβαστές των ορμονικών μηνυμάτων σε κυτταρικό επίπεδο στο οστό (Dempster *et al.*, 2006).

1.2.2 Οστική πυκνότητα

Η Οστική Πυκνότητα είναι ένας ιατρικός όρος που αναφέρεται στην ποσότητα του ανόργανου υλικού (μέταλλα) ανά τετραγωνικό εκατοστό των οστών. Χρησιμοποιείται στην κλινική ιατρική ως ένας έμμεσος δείκτης της οστεοπόρωσης και του κινδύνου κατάγματος καθώς υπάρχει μια στατιστική σχέση ανάμεσα στην χαμηλή οστική πυκνότητα και μεγαλύτερη πιθανότητα κατάγματος (Cole, 2008). Παράλληλα, η οστική πυκνότητα σχετίζεται άμεσα με την μυϊκή μάζα και τη μυϊκή δύναμη (Pocock *et al.*, 1989). Οι σύγχρονες επιστημονικές αντιλήψεις προτείνουν την ανάπτυξη της οστικής πυκνότητας όσο περισσότερο γίνεται στην νεαρή ηλικία, προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος χαμηλών επιπέδων οστικής πυκνότητας σε μεγαλύτερες ηλικίες. (Baechle, *et al.*, 1989) Η μηχανική φόρτιση έχει αποδειχθεί ότι είναι το καλύτερο ερέθισμα στην ενίσχυση της οστικής μάζας και των διαρθρωτικών σκελετικών προσαρμογών που συμβάλουν στην αντοχή των οστών. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ασκήσεις υψηλής έντασης για το κάτω μέρος του σώματος, όπως η ενόργανη γυμναστική, η πετοσφαίριση ή η καλαθοσφαίριση αυξάνουν την οστική πυκνότητα σε κλινικά σημαντικές περιοχές όπως τα ισχία και η σπονδυλική στήλη, σε μεγαλύτερο βαθμό απ'ότι ασκήσεις με χαμηλότερη ένταση. Επιπλέον αύξηση της οστικής μάζας μπορεί να συμβεί ακόμα και σε καλά προπονημένους αθλητές νεαρής ηλικίας που έχουν ήδη υψηλά αρχικά επίπεδα οστικής πυκνότητας (Dook *et al.*, 1997).

1.2.3 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση προκαλεί μείωση της οστικής αντοχής και αύξηση του κινδύνου καταγμάτων. Η οστική αντοχή είναι συνάρτηση της οστικής πυκνότητας και της οστικής ποιότητας. Η οστεοπόρωση αναφέρεται στην απώλεια οστικής πυκνότητας και στην αλλοίωση της δομής των οστών. Η αύξηση της μάζας σώματος εμφανίζεται μεταξύ των ηλικιών 25 και 45 και αποδίδεται κατά ένα μεγάλο μέρος στο μειωμένο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας και στην κακή διατροφή. Η άλιπη μάζα μειώνεται σταδιακά τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες από την ηλικία των 30 με 40 ετών και μετά. Αυτό προκύπτει κυρίως από τη μείωση της μυϊκής και οστικής μάζας με τους μύς να έχουν το μεγαλύτερο μερίδιο, επειδή αποτελούν περίπου το 50% της άλιπης μάζας. Η σαρκοπενία είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απώλεια μυϊκής μάζας που συνδέεται με τη διαδικασία της γήρανσης, ενώ η οστεοπενία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την

απώλεια στην οστική μάζα με τη γήρανση. Ωστόσο, η διατήρηση ενός υγιούς τρόπου ζωής, συνδυασμό δηλαδή διατροφής και άσκησης μπορεί να καθυστερήσει ή και να αναστρέψει μια επιβαρυντική διαδικασία της γήρανσης όπως είναι η οστεοπόρωση (Wilmore *et al.*, 1994).

1.3 Ασκησιογενείς προσαρμογές των οστών

Τα οστά αποτελούν ένα ξεχωριστό είδος συνδετικού ιστού γιατί σε αυτά επανοτίθενται ανόργανα στοιχεία με αποτέλεσμα να αποκτούν ακαμψία και σταθερότητα. Η σύσταση των οστών αποτελείται από ανόργανα συστατικά, οργανικά συστατικά και κύτταρα που συμβάλλουν στην ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου καθώς και στην ανακατασκευή του οστού. Είναι ευαίσθητα σε αλλαγές των εξωτερικών δυνάμεων στις οποίες υπόκεινται όπως σε περίπτωση άσκησης αντιστάσεων, αλλά και σε περίπτωση τραυματισμού έχουν την δυνατότητα ανάπλασης και ανάπτυξης. Η σωματική άσκηση δημιουργεί μηχανικές φορτίσεις που προκαλούν την παραμόρφωση συγκεκριμένων περιοχών του σκελετού. Αυτές οι φορτίσεις μπορεί να είναι καμπτικές, συμπιεστικές, εφελκιστικές ή φορτίσεις που δημιουργούνται από τη συστολή των μυών οι οποίες εφαρμόζονται στις εκφύσεις και καταφύσεις των μυών. Η άσκηση παίζει σημαντικό ρόλο στην σωστή αύξηση των οστών και των σπονδύλων (Baechle *et al.*, 1989). Αν και έχει ελάχιστη ή και μηδενική επίδραση στην επιμήκυνση των οστών, αυξάνει το πάχος και την πυκνότητά τους με την εναπόθεση περισσότερων μετάλλων στη θέμελια ουσία των οστών, γεγονός που αυξάνει την αντοχή αλλά και την ανθεκτικότητα του οστού. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα χρόνια της προ εφηβείας μπορεί να είναι η καταλληλότερη περίοδος διαμόρφωσης του οστού ως απάντηση σε ερέθισμα άσκησης (Bass, 2000).

1.3.1 Η επίδραση της φυσικής δραστηριότητας και της ακινητοποίησης στα οστά

Η σωματική δραστηριότητα πρέπει να έχει ένταση υψηλότερη από εκείνη στην οποία υπόκεινται συνήθως τα οστά, προκειμένου να διεγείρει την ενδυνάμωσή τους. Για παράδειγμα το γρήγορο περπάτημα μπορεί να ξεπερνά αυτήν την ελάχιστη απαιτούμενη επιβάρυνση για έναν ηλικιωμένο, ενώ για πιο νέα και δραστήρια άτομα χρειάζεται μια δραστηριότητα μεγαλύτερης έντασης, όπως το τρέξιμο ή και άσκηση με αντίσταση (Frost

et al., 1997). Πάντως ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και τις προηγούμενες επιβαρύνσεις που έχει δεχθεί ο σκελετός, οι δυνάμεις που ασκούνται στα οστά, θα πρέπει να επιβαρύνουν τον σκελετό περισσότερο από ότι το βάρος του σώματος ώστε να υπάρχουν μεταβολές στις μηχανικές φορτίσεις των οστών. Η επιβάρυνση δηλαδή, θα πρέπει να υπερβαίνει εκείνη που δημιουργεί το σωματικό βάρος ενός ασκούμενου, προκειμένου να είναι αποτελεσματική για τον σχηματισμό νέου οστίτη ιστού.

Από την άλλη πλευρά, η απώλεια της οστικής μάζας μετά από μια περίοδο μειωμένης φυσικής δραστηριότητας ή ακινησίας, συμβαίνει με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό απ' ότι συμβαίνει ο σχηματισμός νέου οστικού ιστού. Μετά από μερικές μόνο εβδομάδες κατάκλισης παρατηρείται ραγδαία απώλεια ασβεστίου από τα οστά που συνεπάγεται απώλεια οστικής μάζας (Krolner *et al.*, 1983).

1.3.2 Εξειδίκευση της επιβάρυνσης

Η αρχή της εξειδίκευσης της επιβάρυνσης είναι ιδιαίτερα σημαντική όταν ο προπονητής σχεδιάζει ένα ασκησιολόγιο με στόχο την αύξηση της οστικής μάζας στις περιοχές του σκελετού. Στο ασκησιολόγιο πρέπει να περιλαμβάνονται ασκήσεις στις οποίες συμμετέχουν μεγάλες μυϊκές ομάδες όπως είναι το στήθος, η πλάτη, οι δικέφαλοι μηριαίοι. Οι φορτίσεις που δημιουργούνται να περνάνε από την σπονδυλική στήλη και τα ισχία και να επιτρέπουν τη χρησιμοποίηση υψηλών αντιστάσεων όπως οι δρομικές ή οι πολυαρθρικές ασκήσεις. Οι μονοαρθρικές ασκήσεις πρέπει να περιορίζονται γιατί διεγείρουν μια συγκεκριμένη ομάδα μυών, ενώ το υπόλοιπο σώμα είναι σταθεροποιημένο. Συνεπώς ασκήσεις όπως το κάθισμα, η άρση μπάρας στους μηρούς, η εκτίναξη μπάρας από τους ώμους καθώς και οι πιέσεις πάγκου συστήνονται για την ανάπτυξη της δύναμης των οστών.

Ωστόσο, τα οστά και ο συνδετικός ιστός έχουν την ιδιότητα να προσαρμόζονται στις μηχανικές φορτίσεις που δέχεται το μυοσκελετικό σύστημα (Granhed *et al.*, 1990). Γι αυτό το λόγο πρέπει να γίνεται προοδευτική επιβάρυνση και αύξηση της αντίστασης σταδιακά καθώς αυξάνεται η ικανότητα των ιστών. Η σωστή εφαρμογή της αρχής της προοδευτικής επιβάρυνσης του μυοσκελετικού συστήματος και της προοδευτικής αύξησης της εξωτερικής αντίστασης, καθώς το σώμα προσαρμόζεται στην άσκηση είναι το κλειδί για την ανάπτυξη της δύναμης των οστών και του συνδετικού ιστού. Αυτό υποστηρίζεται από έρευνες στις οποίες συγκρίθηκε η οστική πυκνότητα αθλητών που συμμετείχαν σε

διαφορετικά αγωνίσματα καθώς και αγύμναστων ατόμων, με την τότε μυϊκή τους μάζα. (Nilsson *et al.*, 1971).

1.3.3 Η μηχανική επιβάρυνση

Όσων αφορά την μηχανική επιβάρυνση υπάρχουν τέσσερις παράμετροι που διεγείρουν την ανάπτυξη των οστών οι οποίες είναι το μέγεθος της αντίστασης, ο ρυθμός εκτέλεσης της άσκησης, η κατεύθυνση εφαρμογή της δύναμης και ο όγκος της επιβάρυνσης. Όσο μεγαλύτερο το μέγεθος της αντίστασης, τόσο ισχυρότερο το ερέθισμα για οστική ανάπτυξη και οι υψηλές ταχύτητες κίνησης ενισχύουν το ερέθισμα για οστική ανάπτυξη. Επίσης η διαφοροποίηση του τρόπου επιβάρυνσης, διατηρώντας σταθερές τις άλλες παραμέτρους, διεγείρει την οστική ανάπτυξη (Frost *et al.*, 1997). Οι αθλητές που στοχεύουν στην ανάπτυξη της μυϊκής μάζας και δύναμης πρέπει να περιλαμβάνουν στα προπονητικά τους προγράμματα όλες τις παραμέτρους της μηχανικής επιβάρυνσης που αναφέρθηκαν παραπάνω.

1.4 Μεταβολικά νοσήματα οστών

1.4.1 Οστεοσάρκωμα

Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου που αναπτύσσεται στα οστά και εμφανίζεται κυρίως σε αφήβους αλλά και σε ενήλικες νεαρής ηλικίας περίπου από την ηλικία των 10-25 χρόνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μορφή καρκίνου προσβάλλει πιο συχνά του άνδρες και λιγότερο τις γυναίκες. Οι πιο συχνές εντοπίσεις στα νέα άτομα αφορούν περιοχές με ταχεία οστική ανάπτυξη και κυρίως στο νέο αναπτυσσόμενο ιστό των οστών. Ωστόσο, τα συμπτώματα του οστεοσαρκώματος αναπτύσσονται αργά και εξαρτώνται από το είδος, τη θέση και το μέγεθος του όγκου. Το πιο συχνό σύμπτωμα που εμφανίζεται είναι ο πόνος των οστών αλλά υπάρχουν και άλλα συμπτώματα όπως είναι τα συχνά κατάγματα των οστών, πυρετός, εφίδρωση και ασυνήθιστο οίδημα γύρω από τα οστά.

1.4.2 Χονδροσάρκωμα

Το χονδροσάρκωμα είναι κύρια πάθηση των ενηλίκων και εμφανίζεται σε ενήλικες μεταξύ 40 έως 60 ετών αλλά δεν είναι απίθανο να εμφανιστεί και σε μικρότερες ηλικίες. Στους άνδρες έχει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και λιγότερο στις γυναίκες. Αυτό το είδος όγκου σχηματίζεται στους χόνδρους, στον ελαστικό ιστό πλησίον των αρθρώσεων. Πιο συγκεκριμένα θεωρείται ο συνηθέστερος κακοήθης όγκος του σκελετού. Συχνά εμφανίζεται στις περοχές του ώμου και της πυελικής ζώνης αλλά και σε σωληνοειδή οστά. Η εκδήλωση του συγκεκριμένου καρκίνου περιλαμβάνει με προοδευτικούς πόνους και πρήξιμο στην περιοχή της βλάβης.

1.4.3 Σάρκωμα του Ewing

Το σάρκωμα του Ewing παρουσιάζεται συνήθως σε παιδιά μικρότερης ηλικίας επειδή ο νευρικός τους ιστός είναι ανώριμος και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μικρών σαρκωμάτων στο μυελό των οστών. Όπως και σε άλλους όγκους, το συγκεκριμένο σάρκωμα εκδηλώνεται με πόνο που επιδεινώνεται προοδευτικά, πυρετό, απώλεια βάρους και κακουχία. Ωστόσο, τη στιγμή της διάγνωσης αυτού του σαρκώματος, το 1/3 των περιπτώσεων εμφανίζουν ήδη μεταστάσεις (Παπαγγελόπουλος κ.α., 2001, Μέγας κ.α., 2002, Paulussen *et al.*, 2001).

1.4.4 Νόσος Paget

Η νόσος Paget ή αλλιώς παραμορφωτική οστεΐτιδα χαρακτηρίζεται από πάχυνση και αύξηση του μεγέθους των οστών των οποίων διαταράσσεται και η εσωτερική αρχιτεκτονική. Μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να οφείλεται στην υπερδιέγερση των οστεοκλαστών. Πιο συγκεκριμένα, το οστό σχηματίζεται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι αποδομείται και έτσι το συνολικό μέγεθός του αυξάνει. Παρ' όλα αυτά όμως η επιμετάλλωση των νεοσχηματιζόμενων οστών είναι ατελής. (Λαμπίρης κ.α., 2003)

1.5 Βιοχημικοί δείκτες οστικής απορρόφησης και παραγωγής

1.5.1 Αλκαλική φωσφατάση

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μια ομάδα ενζύμων που η δράση του συνίσταται στην απελευθέρωση ανόργανων φωσφορικών εστέρων. Παρουσιάζει την μεγαλύτερη δραστικότητα της σε pH=9 και καλείται αλκαλική φωσφατάση προς διάκριση από την όξινο φωσφατάση η οποία είναι λιγότερο δραστική και παρουσιάζει την μεγαλύτερη δραστικότητα της σε pH=5 (Αγγελόπουλος, κ.α., 1976). Η αλκαλική φωσφατάση παράγεται ενδοκυτταρίως και εντοπίζεται στις κυτταρικές επιφάνειες του κυττάρου. (Fishman *et al.*, 1974) Κατά κύριο λόγο βρίσκεται στους οστεοκλάστες, στο ήπαρ και σε μικρότερη ποσότητα στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου (Gomori *et al* 1941,1946)

Όσον αφορά στη βιολογική της αξία το ισοένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης στην κυτταρική μεμβράνη των οστεοβλαστών είναι απαραίτητο για την ασβεστοποίηση ενώ στο ήπαρ δρα στον μεταβολισμό της γλυκόζης (Harris *et al.*, 1989). Η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης εξαρτάται σημαντικά από την ηλικία και αυξάνεται όταν υπάρχει οστική αναγέννηση. Αυξημένη δραστηριότητα παρουσιάζει κατά την βρεφική, πρώτη εφηβική ηλικία και μία μικρή αύξηση στους ηλικιωμένους ενώ στους ενήλικες παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. (Moss *et al.*, 1982) Επίσης, αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης παρουσιάζονται σε παθήσεις των οστών (νόσος Paget) όταν υπάρχει έντονη απορροφητική δραστηριότητα εκ μέρους των οστεοβλαστών. Αντιθέτως, ελαττωμένη δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης παρατηρείται στην κακοήγη αναιμία, στο σκορβούτο και σε παιδιά με κρετινισμό και αχονδροπλασία. (Varley *et al.*, 1980)

1.5.2 Οστεοποντίνη

Η οστεοποντίνη είναι μια φωσφολυριωμένη γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στα υγρά του σώματος όπως το αίμα και τα ούρα, ως εξωκυττάριο μόριο σε όλους τους ιστούς στο ανθρώπινο σώμα αλλά και ως πρωτεΐνη-δομικό συστατικό των ιστών. (Wai *et al.*, 2008) Εκφράζεται από κύτταρα πολλών ιστών όπως από την θεμέλια ουσία των οστών, την οστεΐνη, την οδοντίνη καθώς και από ινοβλάστες, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες (Patarca *et*

al 1993). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που έχει πολυσύνθετο ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες όπως τον μεταβολισμό των οστών, των ιστών, την επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης στη διάρκεια φλεγμονώδων διεργασιών. (Giacopelli *et al* 2004)

1.5.3 Προκολλαγόνο τύπου I

Το προκολλαγόνο τύπου I είναι μια πρόδρομη ουσία του κολλαγόνου που αποτελεί το 90% της οργανικής θεμέλιας ουσίας του οστού. Αποτελείται από δύο πεπτίδια, το προκολλαγόνο I-N και το προκολλαγόνο I-C που θεωρούνται πιθανοί δείκτες οστεοπλασίας. (Parfitt *et al.*, 1987). Στους ασθενείς με ατελή σύνθεση οστού βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα προκολλαγόνου ενώ, υψηλά επίπεδα βρέθηκαν στην νόσο του Paget. (Prockop *et al.*, 1984, Simon *et al.*, 1987)

1.5.4 Οστεονεκτίνη

Η οστεονεκτίνη είναι μια κολλαγονούχος πρωτεΐνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες και θεωρείται ως πιθανός δείκτης οστικού μεταβολισμού. Σε ασθενείς με ατελή οστεογένεση παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα οστεονεκτίνης. Αντιθέτως, μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης αυτής παράγονται από τα αιμοπετάλια και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τον σχηματισμό της θρομβίνης (Termin *et al.*, 1981, Fischer *et al.*, 1987, Stenner *et al.*, 1986).

1.5.5 Υδροξυπρολίνη ούρων

Η υδροξυπρολίνη ούρων θεωρείται ως ο πιο χρησιμοποιούμενος δείκτης οστικής απορρόφησης. Η υδροξυπρολίνη ανήκει στην μεγάλη ομάδα των αμινοξέων καθώς είναι ένα αμινοξύ που βρίσκεται σε διάφορους τύπους κολλαγόνου και αποτελεί το 13% του μορίου της (Prockop *et al.*, 1968). Θεωρείται ως σημαντικός δείκτης οστικής απορρόφησης διότι το μισό περίπου από το κολλαγόνο του ανθρώπινου οργανισμού βρίσκεται στα οστά όπου ο ρυθμός εναλλαγής είναι ταχύτερος από των μαλακών ιστών και το ποσοστό της υδροξυπρολίνης που εκκρίνεται στα ούρα είναι σταθερό (Kivirikko *et al.*, 1983). Πιο συγκεκριμένα, η υδροξυπρολίνη χρησιμοποιείται για παρακολούθηση ασθενών με υψηλούς ρυθμούς οστικής εναλλαγής όπως στην οστεοπόρωση, στη νόσο του Paget. Αυξημένα επίπεδα της υδροξυπρολίνης παρουσιάζονται σε ένα ποσοστό 30% σε

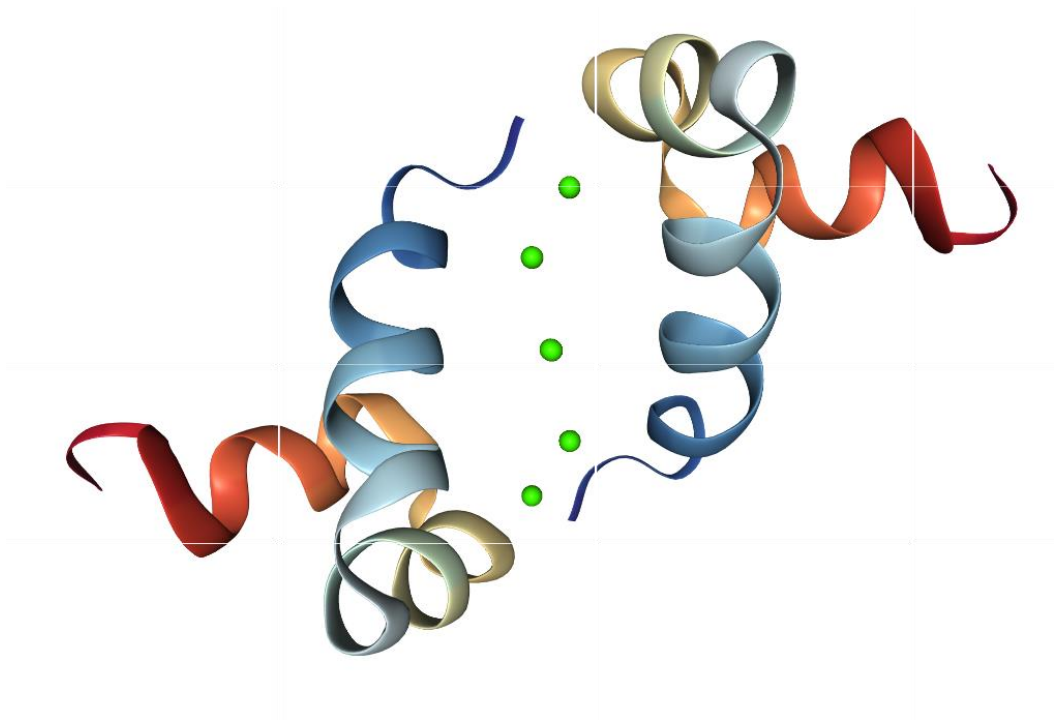
μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υψηλό ρυθμό οστικής εναλλαγής (Gallanger *et al.*, 1973).

1.5.6 Γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ

Άλλος ένας δείκτης οστικής απορρόφησης θεωρείται το γ-καρβογλουταμικό οξύ το οποίο παράγεται από την τροποποίηση μερικών μορίων του γλουταμικού οξέος. Βρίσκεται σε δύο μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας του οστού της οστεοκαλσίνης και της MGB. Ωστόσο συνδέεται με την βιταμίνη καθώς μεγάλο ποσοστό προέρχεται από τους παράγοντες πήξης που εξαρτώνται από την βιταμίνη K. Αυξημένα επίπεδα παρατηρούνται σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό και νόσο Paget (Fournier *et al.*, 1989)

1.6 Οστεοκαλσίνη

Οι οστεοβλάστες είναι εξειδικευμένα μεσεγχυματικά κύτταρα που είναι κυρίως υπεύθυνα για τη σύνθεση και εναπόθεση της ανόργανης πλούσιας σε κολλαγόνο εξωκυττάριας ουσίας που συνθέτει τον ιστό των οστών. Κατά την τελευταία δεκαετία, οι μελέτες έχουν εστιάσει σε μια εκτεταμένη βιολογική λειτουργία για τον οστεοβλάστη που επικεντρώνεται στις δράσεις της οστεοκαλσίνης που προέρχεται από τα οστά (Clemens and Karsenty 2011, Karsenty and Ferron, 2012). Η οστεοκαλσίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως δείκτης σχηματισμού οστεοβλαστικού οστού και πιστεύεται ότι δρα στην εξωκυττάρια ουσία των οστών για να ρυθμίσει την επιμετάλλωση, αλλά νέα γενετικά και φαρμακολογικά στοιχεία δείχνουν τώρα έναν ορμονικό ρόλο για την πρωτεΐνη. Αυτές οι πρόσφατα ανακαλυφθείσες δράσεις συνδέουν τις ενεργειακές απαιτήσεις του οστού με την ομοιόσταση (Clemens and Karsenty 2011, Lee *et al.*, 2007) και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και ορμονών (Bolton *et al.*, 2005, Nussbaum *et al.*, 1985), της λεπτίνης (Ducy *et al.*, 2000, Takeda *et al.*, 2002), της αδιπονεκτίνης (Kajimura *et al.*, 2013) και της ινσουλίνης (Fulzele *et al.*, 2012) στον μεταβολισμό του σκελετού.



Οστεοκαλσίνη απομονωμένη από χοίρο (Hoang., *et al.*, 2003).

1.6.1 Ενεργοποίηση οστεοκαλσίνης

Η οστεοκαλσίνη είναι μια σημαντική μη κολλαγονούχος πρωτεΐνη του οστικού πλέγματος, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται αποκλειστικά από τα οστεοβλαστικά κύτταρα στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης και θεωρείται δείκτης διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Η έκφραση της οστεοκαλσίνης ρυθμίζεται από την παραθορμόνη (PTH) και μια ποικιλία άλλων παραγόντων. Η εξαρτώμενη από cAMP οδός πρωτεϊνικής κινάσης έχειδειχθεί προηγουμένως ότι έχει ουσιώδη ρόλο στη σηματοδότηση της PTH και στη ρύθμιση της έκφρασης οστεοκαλσίνης (Boguslawski *et al.*, 2000).

Οι πρωτεΐνες του πλέγματος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση, την αρχιτεκτονική και τη διαφοροποιημένη λειτουργία του οστού (Ducy and Karsenty, 1996). Ένα κύριο συστατικό της μήτρας του οστού είναι η οστεοκαλσίνη, μια μη-κολλαγονούχος πρωτεΐνη που περιέχει 5-kDa-καρβοξυγλουταμικό οξύ. Η οστεοκαλσίνη συγχωνεύεται και εκκρίνεται αποκλειστικά από ώριμους οστεοβλάστες κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και επιμετάλλωσης του μεταγενέστερου σταδίου (Ducy and Karsenty., 1996, Stein *et al.*, 1996) και επομένως μπορεί να χρησιμεύσει τόσο ως δείκτης σχηματισμού οστού όσο και ως δείκτης του σταδίου ωρίμανσης πληθυσμών οστεοβλαστικών κυττάρων.

Τα γονίδια οστεοκαλσίνης έχουν κλωνοποιηθεί από διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένων αρουραίων, ποντικών και ανθρώπων (Ducy and Karsenty, 1996, Yoon *et al.*, 1988, Celeste *et al.*, 1986). Η έκφραση της οστεοκαλσίνης ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η παραθορμόνη (PTH) (Yu and Chandrasekhar, 1997), η 1,25-διυδροξυ βιταμίνη D3 (Yoon *et al.*, 1988, Zhang *et al.*, 1997), τα οιστρογόνα (Qu, *et al.*, 1998), τα γλυκοκορτικοειδή (Lian, *et al.*, 1997) (Boudreaux, *et al.*, 1996, Newberry, 1996) και το cAMP (Stein *et al.*, 1996, Yu and Chandrasekhar, 1997, Boudreaux, 1996). Η περιοχή υποκινητή οστεοκαλσίνης περιέχει έναν αριθμό πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών οι οποίες μπορεί να είναι υπεύθυνες για την έκφραση αυτών των παραγόντων. Επίσης υπάρχουν αλληλουχίες που θα μπορούσαν να προσδώσουν εξειδίκευση σε είδη και ιστούς (Stein, *et al.*, 1998, Heinrichs *et al.*, 1993).

Η παραθορμόνη είναι ορμόνη που ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργίας των οστών (Fitzpatrick and Bilezikian, 1996). Μια φορά την ημέρα χορήγηση PTH- (1 ± 34) οδηγεί σε αυξημένη οστική πυκνότητα σε ανθρώπους και πειραματόζωα με οστεοπενία (Finkelstein *et al.*, 1996). Αυτή η αύξηση της πυκνότητας των οστών συσχετίζεται με την ενισχυμένη δράση των οστεοβλαστών, οδηγώντας στον σχηματισμό οστού (Onyia *et al.*, 1995). Ενώ ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των οστεοβλαστών από την PTH δεν είναι πλήρως κατανοητός, είναι καλά εδραιωμένο ότι η δράση της ορμόνης στα κύτταρα-στόχους διαμεσολαβείται από τη δέσμευση της PTH σε έναν υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G (Juppner *et al.*, 1991). Η σύνδεση ακολουθείται από την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, από την αύξηση του επιπέδου cAMP και από την ενεργοποίηση της cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Ταυτόχρονα, η φωσφολιπάση C (PLC) μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί, οδηγώντας στην απελευθέρωση του Ca και στην επαγωγή της οδού που συνδέεται με την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Schwartz *et al.* 1997, Yang and Gerstenfeld, 1996). Οι μεταλλάξεις που προκαλούν απενεργοποίηση ή συστηματική ενεργοποίηση των υποδοχέων της PTH σχετίζονται με βαθιά γενετικές ανωμαλίες στους ανθρώπους (Jobert *et al.*, 1998, Schipani, *et al.*, 1996).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η PTH ενεργοποιεί τη μεταγραφή οστεοκαλσίνης, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της εξαρτώμενης από cAMP οδού PKA (Yu, and Chandrasekhar, 1997). Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την παρουσία των ρυθμιστικών αλληλουχιών cAMP εντός του γονιδίου υποκινητού της οστεοκαλσίνης (Yu, and Chandrasekhar, 1997). Ωστόσο, εφόσον αυτός ο υποκινητής περιέχει επιπλέον

δυνητικά στοιχεία απόκρισης, η ενεργοποίησή του από την PTH μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετες οδούς μεταγωγής σήματος.

Για να προσδιοριστεί ο βαθμός στον οποίο άλλες οδοί μπορούν επίσης να επηρεάσουν την έκφραση οστεοκαλσίνης, χρησιμοποιήθηκαν από τους Boguslawski G. *et al.* (2000) κυτταρικές σειρές αρουραίου και ανθρώπινου οστεοβλάστη για να δημιουργήσουν σταθερούς μεταμοσχευμένους κλώνους στους οποίους ο υποκινητής οστεοκαλσίνης συντήχθηκε με ένα γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης. Αυτοί οι κλώνοι εξετάστηκαν για την απόκρισή τους σε παράγοντες γνωστούς για την ενεργοποίηση και την αλληλεπίδραση με μονοπάτια εξαρτώμενα από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και την πρωτεϊνική κινάση O (PKO). Ανακάλυψαν ότι η φορσκολίνη, η cAMP και η PTH, καθώς και ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας I (IGF-I) και ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, ήταν αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του υποκινητή της οστεοκαλσίνης. Το 12-μυριστικό 13-οξικό (PMA) φορβόλης ήταν επίσης ένας ισχυρός επαγωγέας του υποκινητή, υποδεικνύοντας ότι η PKO παίζει ένα ρόλο στην έκφραση της οστεοκαλσίνης. Σε συνδυασμό με PTH ή φορσκολίνη, η επίδραση του PMA ήταν συνεργιστική. Το Calphostin C, ένας εκλεκτικός αναστολέας της PKC, μείωσε τη δραστηριότητα της λουσιφεράσης σε PMA-, PTH- και IOP-I με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Ένας αναστολέας PKA, H-89, επίσης παρεμπόδισε την επαγωγή από την PTH και την IOP-I αλλά όχι από το PMA. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση της μεταγραφής της οστεοκαλσίνης διαμεσολαβείται τόσο από τους εξαρτώμενους από PKA όσο και από τους εξαρτώμενους από PKO μηχανισμούς (Boguslawski *et al.*, 2000).

1.6.2 Δομικές και μεταμεταφραστικές μετατροπές της οστεοκαλσίνης

Η οστεοκαλσίνη, επίσης αναφερόμενη ως πρωτεΐνη γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος (Gla) ή BGP, είναι μια πρωτεΐνη 46-50 αμινοξέων, 5.6kDa που παράγεται από τους οστεοβλάστες (Hauschka *et al.*, 1989). Μικρότερες ποσότητες οστεοκαλσίνης παράγονται επίσης από οδοντοβλάστες των δοντιών και υπερτροφικά χονδροκύτταρα. Η πρωτεΐνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Price *et al.* (Price *et al.*, 1976α,β) από βόειο και ανθρώπινο οστό και φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει το κύριο κλάσμα των πρωτεϊνών που περιέχουν Gla στα οστά. Μια δεύτερη πρωτεΐνη Gla, που απομονώθηκε αργότερα από την ίδια ομάδα, ονομάστηκε πρωτεΐνη Gla εξωκυτταρικής ουσίας (Matrix) ή MGP (Price *et al.*,

1985, 1983). Μαζί, αυτές οι δύο πρωτεΐνες ανήκουν σε μια ξεχωριστή υποομάδα της μεγαλύτερης οικογένειας πρωτεϊνών που εξαρτάται από βιταμίνη K, τα συστατικά των οποίων εμπλέκονται πρωτίστως στην πήξη.

Το γονίδιο ανθρώπινης οστεοκαλσίνης, BGLAP, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 στο 1q25-q31 (Puchacz *et al.*, 1989) και κωδικοποιεί μια προ-προ-πρωτεΐνη 11 kD, 98 αμινοξέων (Σχήμα 1). Το ώριμο πεπτιδίο δημιουργείται με διαδοχικά συμβάντα διάσπασης που απομακρύνουν μια αλληλουχία σηματοδότη ενδοπλασματικού δικτυώματος και την προ-αλληλουχία που ακολουθείται από γ-καρβοξυλίωση τριών υπολειμμάτων γλουταμινικού οξέος στις θέσεις 17, 21 και 24. Και οι τρεις από τις καρβοξυλιώσεις γλουταμινικού

συμβαίνουν κατά τη διάρκεια μίας απλής δέσμευσης του ανώριμου πεπτιδίου με γ-γλουταμυλο καρβοξυλάση (Morris *et al.*, 1995). Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιεί το CO₂, το O₂ και τη βιταμίνη K, που παρέχονται από τον κύκλο και το μεταβολισμό της βιταμίνης K ως συμπράγοντες. Με κάθε κύκλο γ-καρβοξυλίωσης, η βιταμίνη K μετατρέπεται σε εποξειδίο, το οποίο στη συνέχεια θα αναχθεί με αναγωγή εποξειδίου βιταμίνης K για να επιτραπεί ένας ακόμη κύκλος καρβοξυλίωσης (Stafford, 2005). Η ώριμη, καρβοξυλιωμένη πρωτεΐνη οστεοκαλσίνης συσκευάζεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια προς έκκριση στην ενδοκυτταρική ουσία του οστού (Hauschka *et al.*, 1989, Gundberg and Clough, 1992).

Όλες οι πρωτεΐνες Gla που εξαρτώνται από τη βιταμίνη K πιστεύεται ότι έχουν εξελιχθεί από έναν κοινό πρόγονο, διότι μοιράζονται τόσο την ικανότητα να δεσμεύουν το ασβέστιο όσο και τις ίδιες θέσεις αναγνώρισης γ-καρβοξυλάσης (Rice *et al.*, 1994, Sunnerhagen *et al.*, 1996). Οι πρωτεΐνες του ηπατικού Gla που λειτουργούν στην πήξη του αίματος συνδέονται με φωσφολιπίδια συνδεδεμένα με ασβέστιο ενώ η οστεοκαλσίνη δεσμεύεται με ιόντα ασβεστίου στα άλατα υδροξυαπατίτη (Willems *et al.*, 2014).

Τα γονίδια της οστεοκαλσίνης και της MGP φαίνεται να έχουν προκύψει από ένα γονίδιο προγόνων που πρωτοεμφανίστηκε πριν από 500 εκατομμύρια χρόνια πριν από την εξέλιξη των ψαριών χωρίς σαγόνια (Laize *et al.*, 2005). Η MGP εμφανίστηκε πρώτη με την ανάπτυξη χόνδρινων δομών, ενώ ένα γεγονός επικάλυψης γονιδιώματος που συνέπεσε με την εμφάνιση οστικών δομών οδήγησε στην εξέλιξη του γονιδίου της οστεοκαλσίνης. Στους περισσότερους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, η οστεοκαλσίνη κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο το οποίο είναι εξαιρετικά διατηρημένο μεταξύ των ειδών. Ωστόσο, τα ποντίκια περιέχουν μια συστάδα τριών γονιδίων

οστεοκαλσίνης, ενδεικτικά μιας επιπλέον επικάλυψης με καθυστέρηση στην εξέλιξη των τρωκτικών (Desbois *et al.*, 1994).

Δύο από αυτά τα γονίδια, το γονίδιο 1 οστεοκαλσίνης (OG1) και το γονίδιο οστεοκαλσίνης 2 (OG2) εκφράζονται κυρίως στο οστό. Το τρίτο γονίδιο, σχετικό με την οστεοκαλσίνη γονίδιο (ORG), εκφράζεται κυρίως στο νεφρό. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία του ORG παραμένει άγνωστη (Petrucci *et al.*, 2006), έχει προταθεί ότι το ORG κωδικοποιεί την νεφροκαλσικίνη, μια πρωτεΐνη Gla που δεσμεύεται με ασβέστιο και είναι σημαντική στην ομοιόσταση του ασβεστίου (Desbois *et al.*, 1994).

1.6.3 Ο ρόλος της οστεοκαλσίνης στην επιμετάλλωση

Η ώριμη οστεοκαλσίνη εκκρίνεται στο μικρο-περιβάλλον του οστού και στη συνέχεια υφίσταται μια μεταβολή της στερεοδιαμόρφωσης που ευθυγραμμίζει τα κατάλοιπα Gla που δεσμεύουν το ασβέστιο με τα ιόντα ασβεστίου σε υδροξυαπατίτη. Αυτή η ιδιότητα προτάθηκε αρχικά ως ένας μηχανισμός που επιτρέπει στην οστεοκαλσίνη να ξεκινήσει το σχηματισμό κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (Price *et al.*, 1976β). Ωστόσο, υπάρχει η ιδέα ότι η οστεοκαλσίνη λειτουργεί ως αναστολέας της επιμετάλλωσης των οστών. Για την υποστήριξη αυτής της ιδέας, η οστεοκαλσίνη αναστέλλει την κατακρήμνιση αλάτων ασβεστίου από κορεσμένα διαλύματα (Van de Loo *et al.*, 1987) και η χρόνια θεραπεία των τρωκτικών με βαρφαρίνη, έναν αναστολέα γ-καρβοξυλιώσεως που εξαρτάται από τη βιταμίνη K, έχει ως αποτέλεσμα την υπερ-μετάλλωση και την πρόωρη σύγκλιση των επιφύσεων (Price *et al.*, 1982).

Για να μελετηθεί πληρέστερα ο ρόλος της οστεοκαλσίνης στον σχηματισμό οστού, οι Ducy κ.ά. (Ducy *et al.*, 1996) δημιούργησαν ένα οστό οστεοκαλσίνης που στερείται αμφοτέρων γονιδίων οστεοκαλσίνης που εκφράζονται στο οστό. Αυτοί οι ποντικοί εμφάνισαν μια εξαρτώμενη από την ηλικία αύξηση του ρυθμού σχηματισμού οστών και της οστικής μάζας σε σύγκριση με τους μάρτυρες, χωρίς επίπτωση στην οστική απορρόφηση. Η επακόλουθη ανάλυση του οστικού πλέγματος με τη χρήση μικροφασματοσκοπίας υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier έδειξε ότι η αναλογία ανοργάνων στοιχείων αυξήθηκε σε γηρεότερα ζώα. Επιπλέον, το μέγεθος του κρυστάλλου υδροξυαπατίτη ήταν μεγαλύτερο, υποδηλώνοντας ότι η οστεοκαλσίνη μπορεί να ρυθμίζει

την ταχύτητα της ωρίμανσης των αλάτων (Boskey *et al.*, 1998). Εντούτοις, η απόθεση οδοντίνης από οδοντοβλάστες ήταν φυσιολογική σε ποντίκια χωρίς οστεοκαλσίνη (Bronckers *et al.*, 1998), ενώ η ανάλυση ποντικών που υπερεκφράζουν την οστεοκαλσίνη στα οστά αποκάλυψε μια σχετικά φυσιολογική κατάσταση επιμετάλλωσης (Murshed *et al.*, 2004). Επομένως, ο ακριβής ρόλος της οστεοκαλσίνης εντός του οστού παραμένει ασαφής και η ανασταλτική δράση της οστεοκαλσίνης στην επιμετάλλωση των οστών είναι πιθανόν να είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή της MGP, αφού η απομάκρυνση αυτού του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την ασβεστοποίηση της αορτής και την προοδευτική επιμετάλλωση της πλάκας ανάπτυξης (Murshed *et al.*, 2004, Luo *et al.*, 1997).

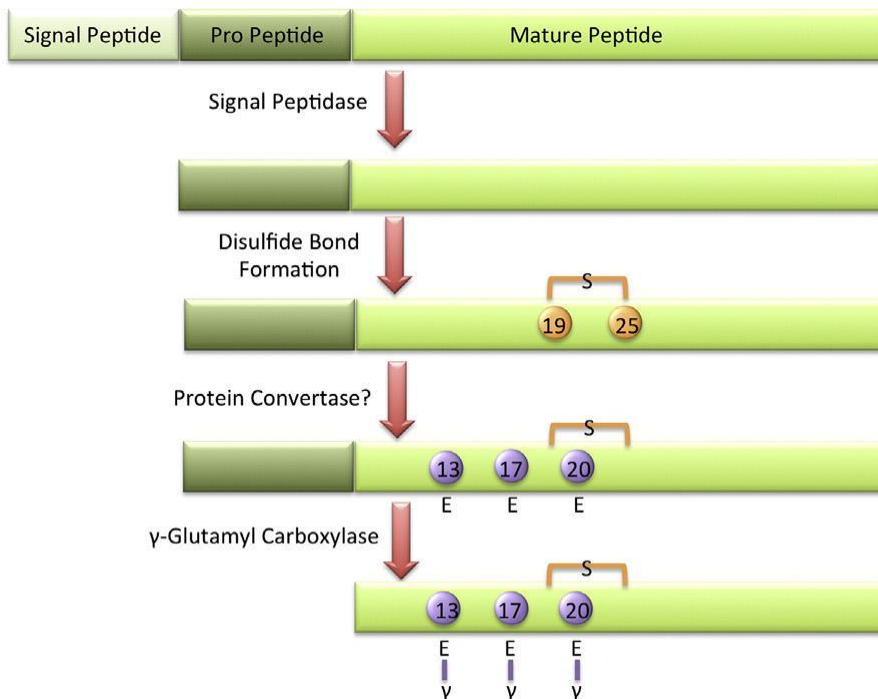
Άλλες μελέτες έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η οστεοκαλσίνη ασκεί μια μηχανική λειτουργία εντός του οστικού πλέγματος. Ως αποτέλεσμα της ικανότητάς του να συνδέει τον υδροξυαπατίτη και να σχηματίζει ένα σύμπλεγμα κολλαγόνου μέσω της οστεοποντίνης (Ritter *et al.*, 1992, Hoang *et al.*, 2003, Hauschka *et al.*, 1982), προτάθηκε η οστεοκαλσίνη ως μέσο για τη γεφύρωση του πλέγματος και των μεταλλικών κλασμάτων του οστικού ιστού. Μια τέτοια διάταξη είναι συμβατή με το σχηματισμό διαστολικών ζωνών που παρατηρούνται σε οστικά κατάγματα. Σε αυτή την περίπτωση, η οστεοκαλσίνη και η οστεοποντίνη θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην πρόληψη της δημιουργίας μικρορωγμών της αρχιτεκτονικής των οστών και τη διάχυση της ενέργειας (Poundarik *et al.*, 2012, Nikel *et al.*, 2013). Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, η αντοχή θραύσης μειώνεται σημαντικά σε ποντίκια που δεν εκφράζουν οστεοκαλσίνη.

A

Human (49 AA)



Mouse (46 AA)

**B**

Σχήμα 1. Α. Δομή οστεοκαλσίνης, μετάφραση και επεξεργασία. (Α) Η δομή της οστεοκαλσίνης χαρακτηρίζεται από τρία υπολείμματα γ -καρβοξυγλουταμικού οξέος και ένα δισουλφιδικό δεσμό. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη περιέχει 49 αμινοξέα με υπολείμματα γ -καρβοξυγλουταμικού οξέος στις θέσεις 17, 21 και 24 και δεσμό δισουλφιδίου μεταξύ υπολειμμάτων κυστεΐνης στις θέσεις 23 και 29. Η πρωτεΐνη ποντικού είναι 3 αμινοξέα συντομότερη με υπολείμματα γ -καρβοξυγλουταμικού οξέος στις θέσεις 13, 17 και 20.

Β. Η οστεοκαλσίνη μεταφράζεται ως προ-προ-πεπτίδιο. Μετά τη διάσπαση της ακολουθίας σήματος το πεπτίδιο μετατοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου σχηματίζεται ένας δεσμός δισουλφιδίου. Μετά την

επεξεργασία σε ένα βήμα δυναμικής πρωτεΐνης μετασχηματισμού, η οστεοκαλσίνη είναι γ-καρβοξυλιωμένη σε τρία υπολείμματα γλουταμινικού οξέος (Zoch M.L. *et al.*, 2015).

1.7 Σωματική άσκηση

Ως σωματική άσκηση ορίζεται οποιαδήποτε κίνηση του σώματος παράγεται από τους σκελετικού μύες και αποδίδει σημαντική αύξηση της ενεργειακής δαπάνης πάνω από την ενεργειακή δαπάνη ηρεμίας. Η σωματική άσκηση συμβάλλει στη βελτίωση της υγείας και προσφέρει αίσθημα ευεξίας. (Bouchard *et al.*, 1993)

Η φυσική άσκηση και η υγεία είναι έννοιες πολύ στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Το ανθρώπινο σώμα είναι σχεδιασμένο ώστε να κινείται και κατά συνέπεια, χρειάζεται συχνή σωματική άσκηση έτσι ώστε να λειτουργήσει σωστά. Η άσκηση είναι το σημαντικότερο ερέθισμα για την ομαλή και συμμετρική ανάπτυξη του μυοσκελετικού συστήματος του σώματος από την γέννηση του ανθρώπου ως την πλήρη σωματική ωριμότητα. Η τακτική σωματική άσκηση παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην υγεία του ανθρώπου, σωματική και ψυχική. Με την μακρόχρονη άσκηση, οι μύες του σώματος ισχυροποιούνται και απαλλάσσονται από το περιττό λίπος. (Σουλίου και Ζορμπάνος, 2012)

1.7.1 Τα οφέλη της άσκησης στην υγεία

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η σωματική άσκηση αποτελεί μια μορφή προστασίας κατά χρόνιων παθήσεων όπως καρδιοπάθειες, παχυσαρκία, υπέρταση. Η άσκηση όχι μόνο διατηρεί και βελτιώνει την υγεία του σώματος αλλά θεραπεύει και ένα σώμα που πάσχει. Δεν απευθύνεται μόνο σε υγιείς ανθρώπους αλλά και σε πάσχοντες με σκοπό να προλαμβάνονται ασθένειες και να βελτιώνονται διάφορες νοσηρές καταστάσεις.

Πιο συγκεκριμένα:

1.7.2 Άσκηση και νευρομυϊκό σύστημα

Η άσκηση συμβάλλει στην διατήρηση της καλής στάσης του σώματος και στην πρόληψη της οσφυαλγίας. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βελτίωση της μυϊκής δύναμης, της ισορροπίας και του νευρομυϊκού συντονισμού. Η μακροχρόνια άσκηση συνδέεται άμεσα με τη βελτίωση της διατακτικής ικανότητας των μυών, των τενόντων, των

συνδέσμων καθώς και στην αύξηση του εύρους κίνησης διαφόρων αρθρώσεων. Παράλληλα, βοηθά στην πρόσληψη και την αποκατάσταση των τραυματισμών στους μυς και στις αρθρώσεις μέσα από δραστηριότητες όπως είναι το κολύμπι, το έντονο περπάτημα και το ποδήλατο (Κουστέλιος κ.α., 2014)

1.7.3 Άσκηση και ενδοκρινικό σύστημα

Η άσκηση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την έκκριση ορμονών που σχετίζονται τόσο με την σωματική ανάπτυξη (τεστοστερόνη, αυξητική ορμόνη) όσο και με την φυσιολογική ισορροπία (ινσουλίνη). Η συστηματική άσκηση επιφέρει αύξηση στην ευαισθησία της ινσουλίνης και συμβάλλει αποτελεσματικά στην καλύτερη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος για την αντιμετώπιση νοσημάτων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και το μεταβολικό σύνδρομο (Κουστέλιος κ.α., 2014).

1.7.4 Άσκηση και καρδιαγγειακό σύστημα

Η συστηματική και ικανοποιητική σε διάρκεια άσκηση μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο για καρδιακά και εγκεφαλικά επεισόδια. Ο καρδιακός μυς δυναμώνει και αυξάνει σε μέγεθος για να βελτιώσει την ικανότητά του να διοχετεύει αίμα, μειώνοντας την καρδιακή συχνότητα ηρεμίας. Η σπουδαιότητα μάλιστα της άσκησης στην μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων είναι τόσο μεγάλη, ώστε να μπορεί να συγκριθεί με αυτής της διακοπής του καπνίσματος ή της μείωσης της αυξημένης αρτηριακής πίεσης. Η προστατευτική δράση στην πρόληψη των καρδιαγγειακών και εγκεφαλικών επεισοδίων φαίνεται ότι δρα μέσω ενός συνδυασμού καταστολής πολλών παραγόντων κινδύνου στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυξάνεται η απόδοση της καρδιάς και μειώνεται η κόπωσή της στην έντονη προσπάθεια. Αυτό γίνεται διότι προσαρμόζεται σε συνθήκες άσκησης απαιτώντας λιγότερη ενέργεια για την λειτουργία της. Επίσης, υπάρχει αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα, έτσι ώστε να μεταφέρεται περισσότερο οξυγόνο στο σώμα. Η άσκηση είναι φυσικός τρόπος για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου και την καλή οξυγόνωση του εγκεφάλου (Κουστέλιος κ.α. 2014).

1.7.5 Άσκηση και ψυχική υγεία

Η συστηματική συμμετοχή σε προγράμματα άσκησης συμβάλει στη μείωση του άγχους και του στρες. Πιο συγκεκριμένα, η άσκηση συμβάλει στην αύξηση των ενδορφινών που σχετίζονται άμεσα με την καλή ψυχική υγεία και την πρόληψη ή ακόμη και την αντιμετώπιση της κατάθλιψης. Επίσης, συνδράμει σε μεγάλο βαθμό στη βελτίωση της αυτοεκτίμησης, της αυτοεικόνας και στην τόνωση της αυτοπεποίθησης. Είναι ευρέως γνωστό ότι η άσκηση χορηγείται ως φάρμακο για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης και από αποτελέσματα ερευνών φαίνεται ότι είναι το ίδιο αποτελεσματική με την ψυχοθεραπεία (Sharkey and Gaskill, 2016).

1.7.6 Άσκηση με αντιστάσεις

Άσκηση με αντιστάσεις ορίζεται η άσκηση η οποία απαιτεί από το μυϊκό σύστημα να κινηθεί απέναντι σε μια εξωτερική αντίσταση. Είναι το είδος της άσκησης το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των διαφόρων μορφών δύναμης. Για τον καθορισμό της άσκησης αντιστάσεων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός διαφόρων παραμέτρων όπως είναι η συχνότητα, τα σετ, οι επαναλήψεις και τα διαλείμματα μεταξύ των επαναλήψεων. (Bachle, Earle and Wathen, 2000)

Παρακάτω θα αναφερθούν οι προσαρμογές στα διάφορα συστήματα του οργανισμού από την άσκηση με αντιστάσεις. Όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα, η άσκηση με αντιστάσεις προκαλεί μικρές μόνο μεταβολές στην καρδιακή παροχή οι οποίες οφείλονται στην αύξηση της καρδιακής συχνότητας (Frankling, 1988). Παράλληλα, σημαντικό γεγονός αποτελεί η απόκριση του ενδοκρινικού συστήματος κατά την άσκηση με αντιστάσεις καθώς το ενδοκρινικό σύστημα υποστηρίζει την ομοιοστατική λειτουργία του οργανισμού και βοηθάει στην ανταπόκριση στα εξωτερικά ερεθίσματα. Οι ορμόνες που παράγονται κατά την διάρκεια της άσκησης με αντιστάσεις μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για το φυσιολογικό στρες και τις μεταβολικές απαιτήσεις του οργανισμού (Elloit , Goldberg and Watts, 1984). Επίσης, η άσκηση με αντιστάσεις αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για την καταπολέμηση της παχυσαρκίας καθώς συμβάλει στη διατήρηση ή την αύξηση της άλιπης σωματικής μάζας, στην αύξηση του μεταβολισμού ηρεμίας και στη μείωση του λιπώδους ιστού. (Walberg *et al.*, 1989) Επίσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση, τη διατήρηση αλλά και τη βελτίωση της μυϊκής απόδοσης

και αντοχής. Άλλος ένας παράγοντας είναι ότι βελτιώνει τη φυσική κατάσταση των αθλουμένων ακόμη και σε καθημερινές δραστηριότητες. Επιπροσθέτως, η άσκηση με αντιστάσεις βελτιώνει το επίπεδο της οστικής πυκνότητας και η αύξηση της μυϊκής μάζας ευνοεί την ανάπτυξη της οστικής μάζας. Ωστόσο, η ένταση, το μέγεθος και η συχνότητα με την οποία εφαρμόζεται η δύναμη έχει επιπτώσεις στη λειτουργία των οστεοβλαστών που είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την αύξηση των οστών. (Mc Ardle and Katch, 1986) Τέλος, από πολλές μελέτες προκύπτει ότι εμφανίζονται υψηλότερες τιμές οστικής πυκνότητας σε αθλούμενους διαφόρων ηλικιών που υποβάλλονται σε προπόνηση δύναμης που συμβάλλει στην μυϊκή υπερτροφία (Αμπατζίδης, 1997).

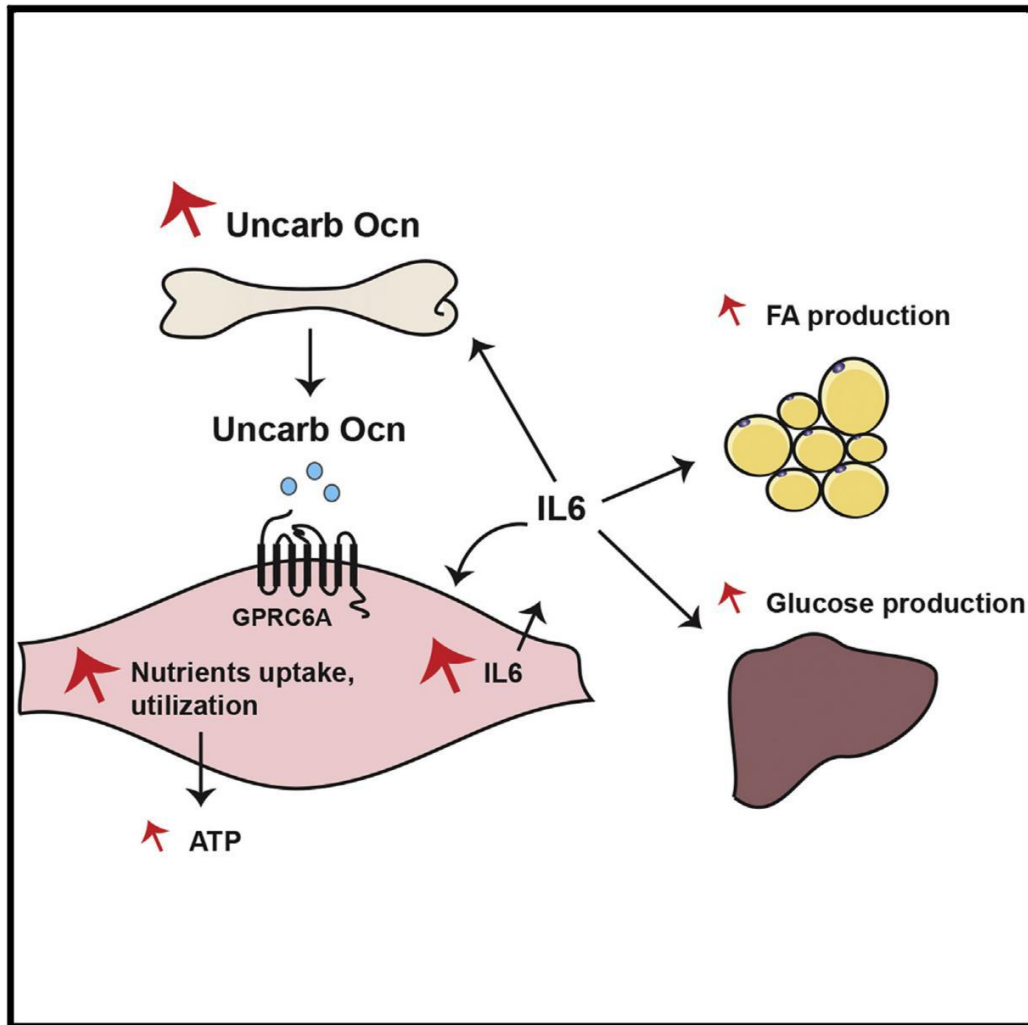
1.7.7 Άσκηση και οστικός μεταβολισμός

Αδιαμφισβήτητος είναι ο ρόλος της άσκησης στην διατήρηση της υγείας του οστικού μεταβολισμού. Η ακινησία ή η ακινητοποίηση ενός μέλους οδηγεί σε απώλεια της οστικής μάζας και πιο συγκεκριμένα σε απώλεια οστικής πυκνότητας. Αντίθετα, η αυξημένη σκελετική φόρτωση μέσω άσκησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής μάζας (Αγγελοπούλου – Σακαντάμη, 2004). Η σωματική άσκηση στην παιδική και εφηβική ηλικία αποτελεί βασικό συστατικό για την απόκτηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης κορυφαίας οστικής μάζας, που είναι πρωτεύων παράγοντας της υγείας των οστών για τα μετέπειτα έτη της ζωής του ανθρώπου. Η κορύφωση της οστικής πυκνότητας επιτυγχάνεται μεταξύ της εφηβείας και το τέλος της τρίτης δεκαετίας, ενώ η συνολική ωρίμανση του σκελετού ολοκληρώνεται κατά την έναρξη της ενηλικίωσης στο 17ο και 18ο έτος (Matkovic *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, μετά την ηλικία περίπου των 35 ετών αρχίζει βαθμιαία η απώλεια οστικής μάζας με ταχύ ρυθμό, τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες. Σύμφωνα με τον σύγχρονο τρόπο ζωής ο περιορισμός της άσκησης οδηγεί στην οστεοπόρωση καθώς η χρόνια ακινητοποίηση σχετίζεται με τον ρυθμό οστικής απώλειας. Ωστόσο, η άσκηση μπορεί να θεωρηθεί ως μέσο πρόληψης της οστεοπόρωσης αλλά και ταυτόχρονα ως μέσο αντιμετώπισης. Η άσκηση μειώνει την απώλεια οστικής πυκνότητας και αυξάνει τη μυϊκή δύναμη και τη μυϊκή μάζα. Επιπλέον, μειώνει τον κίνδυνο πτώσεων, την κόπωση και ανακουφίζει από τους πόνους. Ακόμη, διορθώνει τη στάση του σώματος, αυξάνει την ευκαμψία, βελτιώνει την ικανότητα ισορροπίας καθώς συμβάλλει στην ανάπτυξη και την διατήρηση ενός υγιούς σκελετού (Ρήγα, 2012).

1.8 Οστεοκαλσίνη και μυϊκό σύστημα

Με την αύξηση του προσδόκιμου ζωής, η κοινωνία μας βρίσκεται συνεχώς σε επαφή με ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία. Η διαδικασία γήρανσης χαρακτηρίζεται για παράδειγμα από μεταβολές στη σύνθεση του σώματος που περιλαμβάνουν μείωση μυϊκής μάζας και / ή αντοχής. Αυτή η εκδήλωση της γήρανσης που είναι γνωστή ως απώλεια μυϊκής μάζας (Novotny *et al.*, 2015, Visser, 2009), είναι μια αιτία μιας μεταβολικής απορρύθμισης (Janssen, and Ross, 2005, Chung *et al.*, 2015) και συμβάλλει επίσης στην αυξημένη νοσηρότητα που παρατηρείται στους ηλικιωμένους λόγω του υψηλότερου κινδύνου πτώσεων και καταγμάτων. Μια από τις προτεινόμενες αιτίες αυτής της ηλικιακής συρρίκνωσης της μυϊκής μάζας είναι ο μειωμένος μεταβολισμός των μυϊκών πρωτεϊνών, ο οποίος ορίζεται ως η ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης των μυϊκών πρωτεϊνών και της διάσπασης (Bross, *et al.*, 1999). Ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση των πρωτεϊνών στους μύες, μπορεί να επηρεαστεί από τη γήρανση. Η πρόσφατη απόδειξη ότι η οστεοκαλσίνη οστικής προέλευσης ευνοεί τις μυϊκές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της άσκησης (Karsenty and Olson, 2016, Mera *et al.* 2016) εγείρει το ερώτημα κατά πόσο αυτή η ορμόνη μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη μυϊκή μάζα.

Για να υποστηρίξουμε αυτή την υπόθεση εργασίας παρατηρούμε ότι η οστεοκαλσίνη ευνοεί φυσιολογικές λειτουργίες όπως η σύνθεση τεστοστερόνης και η γονιμότητα του άνδρα (Oury *et al.*, 2013, Oury *et al.*, 2011), η μνήμη ή η προσαρμογή στην άσκηση (Mera *et al.*, 2016, Oury *et al.*, 2013) τείνουν να μειώνονται με την ηλικία. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα της βιοδραστικής οστεοκαλσίνης στο αίμα μειώνονται ραγδαία και απότομα στη διάρκεια ζωής σε ποντίκια, πιθήκους και ανθρώπους (Mera *et al.* 2016). Αυτά τα ευρήματα ήταν δύο επιπλέον κίνητρα για να διερωτηθεί κανείς κατά πόσο η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες παρεμποδίζει επίσης μια άλλη πτυχή της γήρανσης και συγκεκριμένα τη μείωση της μυϊκής μάζας. Φαίνεται ότι η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μυϊκής μάζας σε γηραιότερους ποντικούς επειδή προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών στα μυϊκά κύτταρα. Πιο σημαντικά, η εξωγενής οστεοκαλσίνη είναι επίσης επαρκής για την αύξηση της μυϊκής μάζας σε ποντίκια ηλικίας 10 μηνών. Αυτά τα αποτελέσματα διευρύνουν τη σημασία της ρύθμισης της μυϊκής φυσιολογίας από οστικές ορμόνες και προτείνουν νέες και προσαρμοσμένες θεραπείες για την αντιμετώπιση της απώλειας μυϊκής μάζας που σχετίζεται με την ηλικία.



Σχήμα 2 (Mera *et al.* 2016).

Σε πείραμα των Mera *et al.* (2016) εξετάστηκε η μυϊκή μάζα και η αντοχή στην άσκηση σε ποντίκια που δεν έλαβαν οστεοκαλσίνη (Ocn /) ή υποδοχέα σε όλα τα κύτταρα (Gprc6a /) ή ειδικά σε μυϊκές ίνες (Gprc6aMck /) καθώς και σε ποντικούς WT ηλικίας 9 μηνών που έλαβαν εξωγενή οστεοκαλσίνη για 28 ημέρες. Εξετάστηκε επίσης η σύνθεση πρωτεΐνης σε WT και Gprc6a / μικροσωληνίσκους ποντικού που υποβλήθηκαν σε αγωγή με οστεοκαλσίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μυϊκής μάζας σε γηραιότερα ποντίκια, εν μέρει επειδή προάγει τη σύνθεση των πρωτεϊνών στους μικροσωληνίσκους χωρίς να επηρεάζει τη διάσπαση πρωτεϊνών. Επίσης, φαίνεται ότι η θεραπεία με εξωγενή οστεοκαλσίνη για 28 ημέρες είναι επαρκής για την αύξηση της μυϊκής μάζας ποντικών WT ηλικίας 9 μηνών. Συμπερασματικά, η οστεοκαλσίνη είναι απαραίτητη και επαρκής για την πρόληψη της απώλειας μυών που σχετίζεται με την ηλικία στα ποντίκια (Mera *et al.* 2016).

1.9 Ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης από την οστεοκαλσίνη

Πρόσφατη εργασία από διάφορες ομάδες έχει τώρα δείξει το ρόλο της οστεοκαλσίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Μελέτες από την ομάδα του Karsenty έδειξαν ότι τα ποντίκια που στερούνται οστεοκαλσίνης συσσωρεύουν σωματικό λίπος και εμφανίζουν διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης (Lee *et al.*, 2007, Ducy *et al.*, 1996). Δεδομένου ότι η οστεοκαλσίνη παράγεται μόνο από οστεοβλάστες και μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία, οι Karsenty *et al.* εικάζουν ότι λειτουργίες της οστεοκαλσίνης ως ορμόνη διεξάγονται κατά τρόπο ανάλογο της λεπτίνης και της αδιπονεκτίνης (Εικ. 2). Η παρουσία οστεοκαλσίνης στον ορό, η έκφραση αποκλειστικά στο οστό, και η σύνθεση ως προ-μόριο είναι χαρακτηριστικά μιας τέτοιας λειτουργίας.

Για να επιβεβαιώσουν την υπόθεση, ο Lee *et al.* (2007) και οι συνεργάτες του έκαναν έλεγχο σε οστεοβλάστες με γονίδια που μπορούσαν να ρυθμίσουν τα επίπεδα οστεοκαλσίνης στον ορό. Αυτές οι αναλύσεις προσδιόρισαν το γονίδιο *Esp* (γνωστό επίσης ως *Ptprv*), το οποίο κωδικοποιεί την τυροσινική φωσφατάση (OST-PTP) ως ισχυρό ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης σε ποντίκια. Ποντικοί που στερούνται *Esp* εμφάνισαν μεταβολικό φαινότυπο αντίθετο των ποντικών χωρίς οστεοκαλσίνη, που χαρακτηρίστηκε από υπογλυκαιμία και μειωμένης μάζας λίπος και ακολούθως από υπερινσουλιναίμία, αυξημένο πολλαπλασιασμό β-κυττάρων, και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης ήταν πράγματι τόσο σοβαρή ώστε ένα τμήμα των ποντικών *Esp* - / - δεν επιβίωσε μέχρι τον απογαλακτισμό. Για να δειχθεί μια λειτουργική σύνδεση μεταξύ οστεοκαλσίνης και OST-PTP, τα ποντίκια *Esp* - / - διασταυρώθηκαν με εκείνα που είχαν έλλειψη οστεοκαλσίνης. Η απομάκρυνση ακόμη και ενός απλού αλληλόμορφου της οστεοκαλσίνης διέσωσε τους μεταβολικούς φαινοτύπους των *Esp* - / - ποντικών. Ενώ ο μηχανισμός δεν ήταν γνωστός εκείνη τη στιγμή (βλέπε παρακάτω), το OST-PTP φαίνεται να ρυθμίζει την καρβοξυλίωση και τη βιοδιαθεσιμότητα της οστεοκαλσίνης στην κυκλοφορία του αίματος.

Η υπο-καρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη αύξησε την έκφραση της αδιπονεκτίνης στον λιπώδη ιστό και την έκφραση της ινσουλίνης και της κυκλίνης D1 στα β-κύτταρα, αλλά η γ-καρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη όχι. Με τον τρόπο αυτό, η ενεργοποίηση της οστεοκαλσίνης φαίνεται να μιμείται την ενεργοποίηση της προ-θρομβίνης, η οποία

ενεργοποιείται επίσης όταν τα καρβοξυλιωμένα υπολείμματα απομακρύνονται (Furie *et al.*, 1988). Ωστόσο, η έρευνα μιας άλλης ομάδας πρότεινε ότι τόσο η καρβοξυλιωμένη όσο και η υποκαρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη μπορεί να διεγείρει απόκριση σε λιποκύτταρα και μυοβλάστες (Hill *et al.*, 2014).

Για να εξεταστεί περαιτέρω ο βιολογικός ρόλος της οστεοκαλσίνης, οι Ferron *et al.* (2008) αξιολόγησαν την επίδραση της ορμόνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης σε άγριου τύπου ποντίκια *in vitro*, η ανασυνδυασμένη οστεοκαλσίνη αύξησε τη έκφραση ινσουλίνης και τους δείκτες πολλαπλασιασμού σε πρωτογενή β-κύτταρα. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η θεραπεία με οστεοκαλσίνη αύξησε την έκφραση AdipoQ και Pparg1a σε λευκούς και καφέ λιπώδεις ιστούς. *In vivo*, έγχυση ανασυνδυασμένης οστεοκαλσίνης μέσω υποδόριας αντλίας βελτίωσε την ανοχή στη γλυκόζη και την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν αυτό το αποτέλεσμα και έδειξαν ότι καθημερινές ενέσεις (Ferron *et al.*, 2011) ή από του στόματος χορήγηση (Mizokami *et al.*, 2014a,b) της οστεοκαλσίνης μπορούν να αναιρέσουν τις επιβλαβείς επιδράσεις μιας δίαιτας υψηλού λίπους στο μεταβολισμό. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η χορήγηση οστεοκαλσίνης βελτιώνει τον μεταβολισμό της γλυκόζης δεν είναι ακόμη γνωστός, αλλά μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα της πρωτεΐνης να διεγείρει την απελευθέρωση του πεπτιδίου-1 τύπου γλυκαγόνης, μιας ινκρετίνης που απελευθερώνεται από εντερικά ενδοκρινικά κύτταρα που διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης ((Mizokami *et al.*, 2014b). Άλλες ευεργετικές δράσεις της οστεοκαλσίνης φαίνεται να περιλαμβάνουν την ικανότητά της να αναστρέφει την αυτοφαγική δυσλειτουργία και το στρες ενδοπλασματικού δικτύου που προκαλείται από την παχυσαρκία (Zhou *et al.*, 2013a,b).

1.10 Ρόλος της οστεοκαλσίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης

Η ανακάλυψη του ρόλου της οστεοκαλσίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης αναδείχθηκε από τους Fulzele κ.ά. (Fulzele *et al.*, 2010,2007) κατά τη διάρκεια μελετών που σχεδιάστηκαν για να εξετάσουν τις δράσεις της ινσουλίνης στους οστεοβλάστες. Σε αυτές τις μελέτες, τα ποντίκια που είχαν έλλειψη υποδοχέα ινσουλίνης ειδικά σε οστεοβλάστες (IRflox, Oc-Cre) ανέπτυξαν έναν μεταβολικό φαινότυπο που

θυμίζει τους ποντικούς οστεοκαλσίνης που περιγράφονται από την ομάδα Karsenty (Lee *et al.*, 2007).

Τα ποντίκια συσσωρεύσαν σωματικό λίπος και εμφάνισαν υπεργλυκαιμία και είχαν ελαττωμένη συγκέντρωση ινσουλίνης στον ορό. Η αποκωδικοποίηση του RNA από τους οστεοβλάστες IRflox, ανέδειξε την οστεοκαλσίνη ως μείζον γονίδιο που ανταποκρίνεται στην ινσουλίνη στους οστεοβλάστες, γεγονός που υποστήριζε την υπόθεση ότι η σηματοδότηση υποδοχέα σουλφίνης στους οστεοβλάστες απαιτείται για την παραγωγή οστεοκαλσίνης. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η χορήγηση οστεοκαλσίνης στους μεταλλαγμένους ποντικούς για τον υποδοχέα της ινσουλίνης βελτίωσε τον μεταβολισμό της γλυκόζης, δείχνοντας ότι η ινσουλίνη και η οστεοκαλσίνη σχηματίζουν ένα ενδοκρινικό κύκλωμα μεταξύ οστού και παγκρέατος.

Ο Ferron και συνεργάτες (Ferron *et al.*, 2010) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αυτής της συσχέτισης, αλλά πρότειναν έναν διαφορετικό μηχανισμό για τη ενεργοποίηση της οστεοκαλσίνης. Δομική ανάλυση της καταλυτικής περιοχής του OST-PTP έδειξε ότι παρουσιάζει ομολογία με άλλες φωσφατάσες όπως η PTP1B (Delibegovic *et al.*, 2009, 2007), που δρουν αποφωσφορυλιώνοντας τον υποδοχέα της ινσουλίνης (Ferron *et al.*, 2010). Άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι ο υποδοχέας ινσουλίνης είναι στόχος της OST-PTP και η απώλεια της λειτουργίας OST-PTP σε οστεοβλάστες Esp - / - παρήγαγε αυξημένη σηματοδότηση ινσουλίνης. Αυτή η αύξηση της σηματοδότησης της ινσουλίνης σε ποντίκια Esp - / - θεωρήθηκε ότι αυξάνει την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, η οποία με τη σειρά της αποκαρβοξυλίωσε την ενσωματωμένη στο οστικό πλέγμα οστεοκαλσίνη στο χαμηλό pH της κοιλότητας επαναρρόφησης (Engelke *et al.*, 1991) για να διευκολύνει την απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία. Επιπλέον, τα οστεοπετρωτικά ποντίκια και οι άνθρωποι που στερούνται λειτουργικών οστεοκλαστών είχαν χαμηλότερα επίπεδα υποκαρβοξυλιωμένης οστεοκαλσίνης και εμφάνιζαν μειωμένη ανοχή γλυκόζης. Συνυπολογίζοντας τις μελέτες των Fulzele *et al.* (2010) και Ferron *et al.* (2010) φαίνεται ότι η ινσουλίνη ρυθμίζει την παραγωγή οστεοκαλσίνης και επίσης προάγει τη βιοδιαθεσιμότητά της ευνοώντας την αποκαρβοξυλίωση.

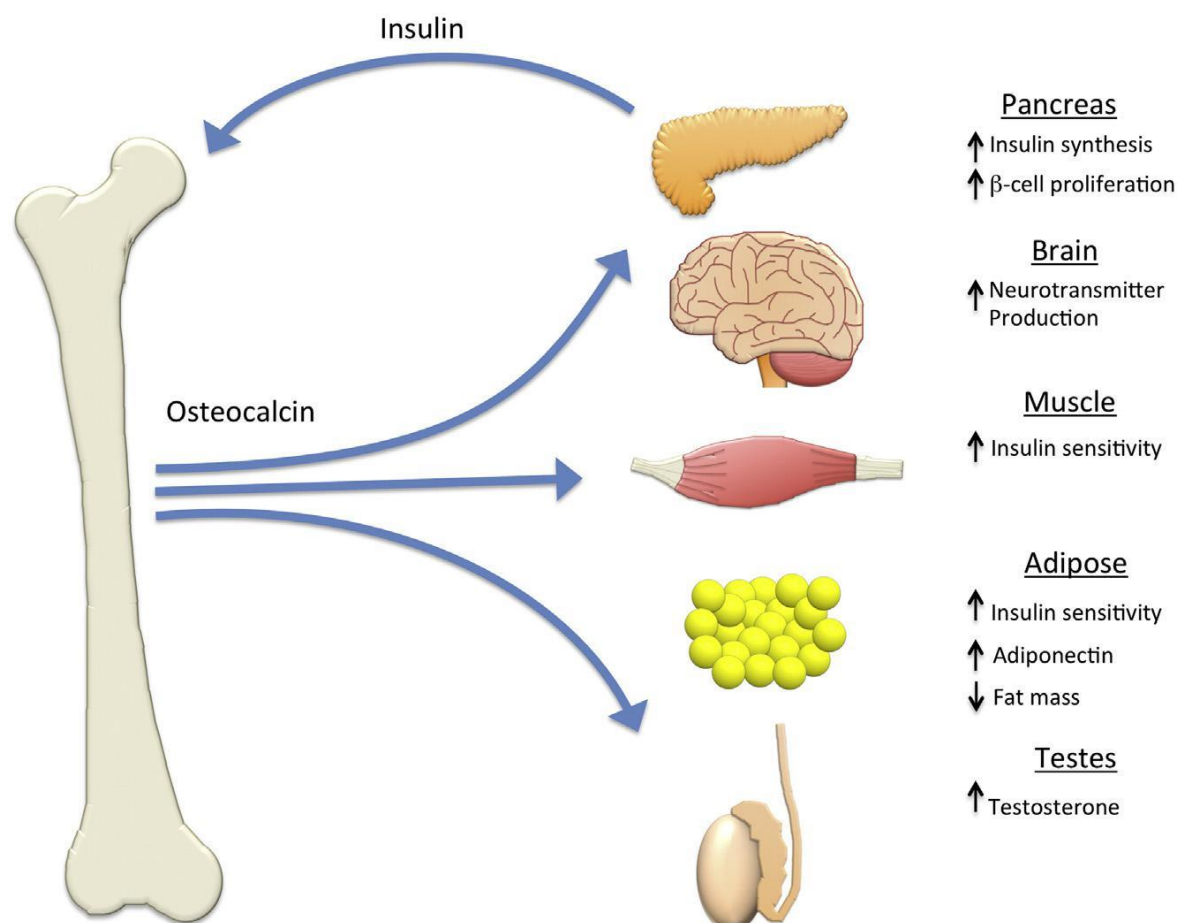
Ο μεταγραφικός μηχανισμός μέσω του οποίου η ινσουλίνη διεγείρει την παραγωγή οστεοκαλσίνης έχει επίσης διερευνηθεί. Οι FoxOs είναι μείζονες μεταγραφικοί μεσολαβητές της δράσης της ινσουλίνης και επηρεάζουν την απόκριση σε πολλά κύτταρα-στόχους ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένων των β-κυττάρων, των λιποκυττάρων και των ηπατοκυττάρων (Accilli and Arden, 2004). Η Rached *et al.* (2010) αναγνώρισαν τρεις

θέσεις δέσμευσης FoxO στο γονίδιο της οστεοκαλσίνης και διαπίστωσαν ότι το FoxO1 είναι ένας ισχυρός καταστολέας της οστεοκαλσίνης. Οι ποντικοί που καθίστανται ανεπαρκείς σε παράγοντα μεταγραφής στους οστεοβλάστες (FoxO1flox, Collagen1-Cre) παρουσίασαν αυξημένο πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών β-κυττάρων, έκκριση ινσουλίνης και ευαισθησία στην ινσουλίνη και δευτερευόντως αυξημένη έκφραση και βιοενεργοποίηση οστεοκαλσίνης (Rached *et al.*, 2010). Η παρεμπόδιση της έκφρασης της οστεοκαλσίνης από το FoxO1 μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την αλληλεπίδρασή του με τον μεταγραφικό παράγοντα Atf4 (Kode *et al.*, 2012), ο οποίος επίσης καταστέλλει τη βιοενεργοποίηση της οστεοκαλσίνης (Yoshizawa *et al.*, 2009) και μέσω της αναστολής της δραστηριότητας του Runx2 (Yang *et al.*, 2011).

Η σηματοδότηση Tor ασκεί έλεγχο και στην παραγωγή της οστεοκαλσίνης. Τα ποντίκια με ανεξέλεγκτη σηματοδότηση mTOR στους οστεοβλάστες μέσω της γενετικής αφαίρεσης του γονιδίου Tsc2 είχαν 10-φορές υψηλότερα επίπεδα υποκαρβοξυλιωμένης οστεοκαλσίνης και ανέπτυξαν απευαισθητοποίηση στην ορμόνη (Riddle *et al.*, 2014). Ενώ οι νεαροί ποντικοί είχαν χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης, τα ηλικιωμένα ποντίκια εμφάνιζαν αντίσταση στη γλυκόζη και στην ινσουλίνη ορού και μείωση στην έκφραση της Gprc6a. Η υπερπαραγωγή της οστεοκαλσίνης σε αυτά τα ποντίκια φαίνεται να είναι δευτερεύουσα στην αναστολή της δραστηριότητας FoxO1.

Επειδή η οστεοκαλσίνη παράγεται από διαφοροποιημένους οστεοβλάστες, η παραγωγή οστεοκαλσίνης επηρεάζεται επίσης σε μοντέλα ποντικού σχεδιασμένα να παρεμβαίνουν στην ωρίμανση των οστεοβλαστών. Δύο τέτοια παραδείγματα περιλαμβάνουν τον παράγοντα μεταγραφής Fra-2 (Fosl2) και την εξαρτώμενη από βιταμίνη K γ-γλουταμυλο καρβοξυλάση (GGCX). Το Fra-2 παίζει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό της οστεοβλαστογένεσης (Bozec *et al.*, 2010) και ρυθμίζει επίσης την παραγωγή οστεοκαλσίνης. Η υπερ-έκφραση του Fra-2 στους οστεοβλάστες οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οστεοκαλσίνης, μειωμένο σωματικό βάρος και μειωμένη γλυκόζη στον ορό με βελτιωμένη ανοχή στη γλυκόζη και ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ τα ποντίκια knockout έχουν τον αντίθετο φαινότυπο (Bozek *et al.*, 2013). Το GGCX διαδραματίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας της οστεοκαλσίνης επειδή καταλύει τη μετατροπή του γλουταμικού οξέος προς γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ. Η γενετική απομάκρυνση αυτού του γονιδίου σε οστεοβλάστες αύξησε τα επίπεδα καρβοξυλιωμένης οστεοκαλσίνης στον ορό, παράλληλα με βελτιωμένη ανοχή στη γλυκόζη και μειωμένη μάζα λίπους (Shiba *et al.*, 2014, Ferroun *et al.*, 2015). Ένας παρόμοιος φαινότυπος

παρατηρήθηκε σε ποντίκια στα οποία το *Vkorc1*, το ένζυμο που ήταν υπεύθυνο για την ανακύκλωση βιταμίνης K, αφαιρέθηκε ειδικά από τους οστεοβλάστες (Feron *et al.*, 2015)..



Σχήμα 3. Ορμονικές επιδράσεις της οστεοκαλσίνης στο μεταβολισμό του σώματος. Σε απόκριση στην ινσουλίνη, η καρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη παράγεται από τους οστεοβλάστες ή απελευθερώνεται από τα οστά και εισέρχεται στην κυκλοφορία όπου ενεργεί ως ορμόνη. Η οστεοκαλσίνη προκαλεί αύξηση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, η οποία μπορεί μερικώς να προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή αδιπονεκτίνης από λιπώδη ιστό. Στο πάγκρεας, η οστεοκαλσίνη προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των β -κυττάρων καθώς και αυξημένη παραγωγή ινσουλίνης. Πρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι η οστεοκαλσίνη δρα στον εγκέφαλο για να διεγείρει την παραγωγή νευροδιαβιβαστών και στους όρχεις για την αύξηση της παραγωγής τεστοστερόνης (Zoch, *et al.*, 2015).

1.11 Η οστεοκαλσίνη στη γονιμότητα και τη νόηση

Η μελέτη των ποντικών osteocalcin null (απουσία έκφρασης οστεοκαλσίνης) από τους Karsenty και Oury (2014) οδήγησε στην περιγραφή δύο επιπλέον ορμονικών

λειτουργιών για την υποκαρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη. Πρώτον, παρατηρήθηκε ότι οι ποντικοί οστεοκαλσίνης null εμφανίζουν υπογονιμότητα. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε τους Oury *et al.* (2011) να υποθέσουν ότι η υποκαρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη δρα για να ρυθμίσει τη γονιμότητα και πιθανώς την παραγωγή των στεροειδών ορμονών του φύλου. Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα επηρεάζουν πολύ την ανάπτυξη και τη συντήρηση του σκελετού (Manolagas *et al.*, 2002), αλλά δεν έχει εξεταστεί η σηματοδότηση στην αντίθετη κατεύθυνση (δηλαδή από το οστό προς γονάδες). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η χορήγηση υποκαρβοξυλιωμένης οστεοκαλσίνης αύξησε την παραγωγή τεστοστερόνης από τους όρχεις αλλά δεν επηρέασε τα επίπεδα οιστραδιόλης ή προγεστερόνης που παρήχθησαν από ωοθηκικά εκφυτεύματα. Φάνηκε επίσης ότι οι μεταλλαγμένοι ποντικοί έχουν χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ολιγοσπερμία και μειωμένο βάρος των αναπαραγωγικών οργάνων ενώ η χορήγηση οστεοκαλσίνης αύξησε αυτές τις παραμέτρους ανδρικής γονιμότητας. Συγκεκριμένα, τα ποντίκια Esp - / - που έχουν αυξημένη σηματοδότηση ινσουλίνης σε οστεοβλάστες (Ferron *et al.*, 2010) έχουν βρεθεί ότι έχουν ενισχυμένη γονιμότητα, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα η σηματοδότηση της ινσουλίνης στον οστεοβλάστη να ρυθμίζει την αρσενική γονιμότητα. Αυτή η ιδέα επιβεβαιώθηκε σε μεταγενέστερη εργασία (Oury *et al.*, 2013) που έδειξε ότι η ινσουλίνη ευνοεί την αρσενική γονιμότητα με την τόνωση της οστικής εναλλαγής και της μεσολαβούμενης από τους οστεοκλάστες ενεργοποίησης της οστεοκαλσίνης. Ενώ αυτές οι μελέτες προσδιόρισαν έναν υποτιθέμενο υποδοχέα για την οστεοκαλσίνη (που περιγράφεται παρακάτω), παραμένει ασαφές ποια είναι η επίδραση των διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης στη γονιμότητα σε ocn - null (απουσία έκφρασης οστεοκαλσίνης) ποντίκια.

Επιπλέον, οι διαταραχές συμπεριφοράς που παρατηρήθηκαν σε ποντίκια χωρίς οστεοκαλσίνη οδήγησαν στον σχεδιασμό πρόσθετων μελετών που αποκάλυψαν νέες δράσεις της οστεοκαλσίνης στον εγκέφαλο. Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η οστεοκαλσίνη παράγεται στον εγκέφαλο και μπορεί να λειτουργήσει ως νευροπεπτίδιο (Patterson *et al.*, 2012). Ωστόσο, η εργασία του Oury *et al.* (2013) έδειξε ότι η κυκλοφορούσα οστεοκαλσίνη διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δρα στο στέλεχος του εγκεφάλου, στο μεσεγκέφαλο και στον ιππόκαμπο για να επηρεάσει τη σύνθεση πολλών νευροδιαβιβαστών που ευνοούν τη λειτουργία της μάθησης και της μνήμης. Σε αυτές τις μελέτες, η οστεοκαλσίνη φάνηκε ότι προάγει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης και αναστέλλει εκείνα τα γονίδια που απαιτούνται για τη σύνθεση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA)

ενώ σημειώθηκαν και αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα σεροτονίνης, ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης και GABA. Σύμφωνα με την υπόθεση ότι η οστεοκαλσίνη που προέρχεται από τα οστά δρα στον εγκέφαλο, η οξεία διάσπαση της έκφρασης οστεοκαλσίνης στον οστεοβλάστη οδήγησε σε ένα φαινότυπο συμπεριφοράς όμοιο με τους χωρίς οστεοκαλσίνη ποντικούς. Συγκεκριμένα, η μητρική παραγωγή οστεοκαλσίνης φαίνεται να είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου του εμβρύου. Η οστεοκαλσίνη μπορεί να βρεθεί στο εμβρυϊκό αίμα προτού εκφραστεί κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των οστών και τα νεογνά που γεννιούνται από μητέρες με πολύ χαμηλά επίπεδα οστεοκαλσίνης έχουν αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στον ιππόκαμπο. Ενώ απαιτούνται σημαντικές πρόσθετες εργασίες, αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν την πιθανότητα να συνδεθούν οι γνωσιακές αναπηρίες και με τα μεταβολικά νοσήματα όπως στην κλειδοκρανιακή δυσπλασία.

1.12 Gprc6a: υποδοχέας οστεοκαλσίνης

Η επίδειξη συγκεκριμένων λειτουργιών της υποκαρβοξυλιωμένης οστεοκαλσίνης προκάλεσε τον σχεδιασμό περισσότερων μελετών για τον εντοπισμό του υποδοχέα της στους ιστούς-στόχους. Ο Gprc6a, ένας συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας χωρίς προηγούμενη γνωστή λειτουργία, εκφράζεται από μία ποικιλία κυτταρικών τύπων περιλαμβανομένων εκείνων που βρέθηκαν να ανταποκρίνονται στην κυκλοφορούσα οστεοκαλσίνη (Kuang *et al.*, 2005, Pi *et al.*, 2005) και ενεργοποιείται από έναν αριθμό μη σχετιζόμενων προσδεμάτων, συμπεριλαμβανομένων κατιόντων, όπως το ασβέστιο και ο ψευδάργυρος, και αμινοξέα όπως L-Arg και L-Lys (Conigrave *et al.*, 2006, 2010). Πιστεύεται ότι αυτό επιτρέπει στον Gprc6a και σε άλλους υποδοχείς στην οικογένειά του να λειτουργούν ως αισθητήρες της προτεινικής θρέψης (Clemmensen *et al.*, 2014) αλλά δύο παράλληλες έρευνες τελικά οδήγησαν στην αναγνώριση του Gprc6a ως υποδοχέα της οστεοκαλσίνης. Πρώτον, οι μελέτες γονιδιακής εξουδετέρωσης έδειξαν ότι η απώλεια της λειτουργίας Gprc6a παράγει έναν φαινότυπο σχεδόν ταυτόσημο με τους ποντικούς οστεοκαλσίνης null (κατεσταλμένη έκφραση οστεοκαλσίνης). Αυτά τα ζώα συσσωρεύουν λίπος και εμφανίζουν υπεργλυκαιμία, δυσανεξία στη γλυκόζη και αντίσταση στην ινσουλίνη με μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης που οδηγούν σε στειρώση (Pi *et al.*, 2008). Δεύτερον, οι Oury *et al.* (2011) μείωσαν τον αριθμό των πιθανών υποδοχέων οστεοκαλσίνης συγκρίνοντας την έκφραση υποδοχέων με άγνωστους συνδέτες στα

κύτταρα Leydig των όρχεων με αυτά που εκφράζονται από τις μη ανταποκρινόμενες ωοθήκες και εξέτασαν μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιημένα μετά από χορήγηση οστεοκαλσίνης. Η οστεοκαλσίνη παρήγαγε σταθερά αύξηση των επιπέδων cAMP στα κύτταρα Leydig και η φαρμακοκινητική αυτής της απόκρισης έδειξε ότι ο υποδοχέας ήταν συζευγμένος με πρωτεΐνη G. Αυτές οι αναλύσεις οδήγησαν στην ταυτοποίηση 4 πιθανών υποδοχέων συμπεριλαμβανομένου του Gprc6a, το οποίο ήταν γνωστό ότι παρήγαγε φαινότυπο γονιμότητας παρόμοιο με ποντικούς οστεοκαλσίνης null (Oury *et al.*, 2011, Pi *et al.*, 2008).

Τα β κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων εκφράζουν επίσης την Gprc6a και η δέσμευση της οστεοκαλσίνης σε αυτόν τον υποδοχέα ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω της οδού κινάσης MAP (Pi *et al.*, 2011). Η γενετική απενεργοποίηση του υποδοχέα στην οικογένεια των β-κυττάρων (Gprc6aflox Pdx1-Cre ποντίκια) έχει ως αποτέλεσμα υπεργλυκαιμία, υπερσουλιναιμία και δυσανεξία στη γλυκόζη λόγω ελαττώματος στον πολλαπλασιασμό β-κυττάρων που προκαλείται από την οστεοκαλσίνη (Wei *et al.*, 2014). Η ανάπτυξη ενός ταυτόσημου μεταβολικού φαινοτύπου σε ποντικούς χωρίς ένα αλληλόμορφο οστεοκαλσίνης και ένα αλληλόμορφο Gprc6a στο β-κύτταρο παρέχει επιπλέον γενετικά στοιχεία για την υπόθεση ότι η οστεοκαλσίνη και η Gprc6a βρίσκονται στην ίδια γενετική αλληλουχία.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, φαίνεται ότι το Gprc6a διαμεσολαβεί τις λειτουργίες της οστεοκαλσίνης και σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του μυϊκού, του λιπώδους και του οστίτη ιστού. Είναι πάντως πιθανό να υπάρχουν και άλλοι μη ταυτοποιημένοι υποδοχείς για την οστεοκαλσίνη καθώς η επίδραση της ανεπάρκειας οστεοκαλσίνης στην έκκριση νευροδιαβιβαστών και στη συμπεριφορά δεν επαληθεύεται σε ποντίκια GPRC6A-null (Oury *et al.*, 2013).

1.13 Προσαρμογή στην άσκηση

Η ικανότητα άσκησης είναι μια εξελικτική λειτουργία αυτοσυντήρησης που ήταν απαραίτητη για την επιβίωση των περισσότερων σπονδυλωτών και έχει σήμερα σημαντικά οφέλη για την υγεία (Neufer *et al.*, 2015, Zierath and Wallberg-Henriksson, 2015). Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η μυϊκή λειτουργία πρέπει να αυξηθεί σημαντικά. Αυτό απαιτεί ότι η πρόσληψη και ο καταβολισμός των δύο βασικών θρεπτικών συστατικών των μυϊκών ινών, της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων (FAs) αυξάνεται σημαντικά (Haw-ley *et al.*,

2014). Ως αναβολική ορμόνη, η ινσουλίνη προάγει την πρόσληψη γλυκόζης στις μυϊκές ίνες και την αποθηκεύει με τη μορφή γλυκογόνου. (Saltiel and Pessin, 2002) Ωστόσο, η ινσουλίνη δεν προάγει τον καταβολισμό της γλυκόζης και τα επίπεδα κυκλοφορίας της μειώνονται κατά τη διάρκεια της άσκησης (Coderre *et al.*, 1995, Lund *et al.*, 1995). Αυτό υποδηλώνει ότι η αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών και ο καταβολισμός τους στους μυς, που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της άσκησης μπορεί να ευνοηθεί από άλλα εκκρινόμενα μόρια, μυοκίνες (Catoire and Kersten, 2015) ή ορμόνες, τα επίπεδα των οποίων στον ορό θα αυξάνονταν κατά τη διάρκεια της άσκησης. Είναι πιθανό ότι οι μυοκίνες και οι ορμόνες μπορούν να ευνοήσουν την προσαρμογή στην άσκηση.

Η ικανότητα του οστού να ανιχνεύει τις μηχανικές δυνάμεις, η φυσική γειτνίαση των δύο ιστών (μυϊκού και οστίτη) και το γεγονός ότι η ικανότητα άσκησης και η οστική μάζα μειώνονται ταυτόχρονα έχουν προ πολλού υποδηλώσει ότι μπορεί να υπάρχει μια σχέση μεταξύ οστού και μυών (Novotny *et al.*, 2015). Η ταυτοποίηση των ορμονών που παράγονται από τους οστεοβλάστες και των υποδοχέων τους μας επιτρέπει να ελέγξουμε εάν το οστό ρυθμίζει τη λειτουργία των μυών σε κατάσταση ηρεμίας ή κατά τη διάρκεια της άσκησης και να διασαφηνίσει τις μοριακές βάσεις αυτής της λειτουργίας. Ένας άλλος λόγος για να τεθεί αυτό το ερώτημα προκύπτει από ένα χαρακτηριστικό της οστεοκαλσίνης που προέρχεται από τα οστά: αυτή η ορμόνη ευνοεί τις φυσιολογικές λειτουργίες που, όπως η μνήμη και η αρσενική γονιμότητα, μειώνονται σημαντικά με την ηλικία (Oury *et al.*, 2011, 2013). Αυτή η παρατήρηση αυξάνει την πιθανότητα να μπορεί η οστεοκαλσίνη να ρυθμίζει άλλες φυσιολογικές διεργασίες που επηρεάζονται σοβαρά από τη γήρανση, όπως η μυϊκή λειτουργία κατά την άσκηση (Partridge and Gems, 2002).

Τα επίπεδα της υποκαρβοξυλιωμένης και βιοενεργής οστεοκαλσίνης στο αίμα διπλασιάζονται κατά τη διάρκεια της αερόβιας άσκησης στα χρονικά επίπεδα της μείωσης της ινσουλίνης. Αντίθετα, τα επίπεδα κυκλοφορίας του οστεοκαλσίνης μειώνονται νωρίς κατά την ενηλικίωση σε ποντίκια, πιθήκους και ανθρώπους και των δύο φύλων. Η διερεύνηση αυτών των παρατηρήσεων αποκάλυψε ότι η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες είναι απαραίτητη για την προσαρμογή στην άσκηση με την ευνοϊκή πρόσληψη και καταβολισμό της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, των κυριότερων θρεπτικών συστατικών των μυϊκών ινών. Η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες αντιπροσωπεύει επίσης το μεγαλύτερο μέρος της προκαλούμενης από την άσκηση απελευθέρωσης της ιντερλευκίνης-6, μιας μυοκίνης που προάγει την προσαρμογή στην άσκηση εν μέρει προάγοντας τη δημιουργία βιοδραστικής οστεοκαλσίνης. Επίσης,

δείχτηκε ότι η εξωγενής οστεοκαλσίνη επαρκεί για να ενισχύσει την ικανότητα άσκησης νεαρών ποντικών και να αποκαταστήσει στα ποντίκια ηλικίας 15 μηνών την ικανότητα άσκησης ποντικών ηλικίας 3 μηνών. Αποκαλύπτεται επομένως ένας ενδοκρινικός άξονας από τον ορό προς τους μυς που ευνοεί την προσαρμογή στην άσκηση και μπορεί να αντιστρέψει τη μείωση της ικανότητας άσκησης λόγω ηλικίας (Mera *et al.*, 2016).

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Δοκιμαζόμενοι

Έντεκα άνδρες ηλικίας $22,5 \pm 3,3$ χρονών με ύψος 181 ± 5 cm και σωματικό βάρος $81,6 \pm 5,6$ κιλά συμμετείχαν στην μελέτη. Πριν από την έναρξη της μελέτης η Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης ενέκρινε το πειραματικό πρωτόκολλο και όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Οι δοκιμαζόμενοι ταξινομήθηκαν από μέτρια έως καλά εκπαιδευμένοι και είχαν προηγούμενη εμπειρία από 6 μήνες έως 3 χρόνια σε ασκήσεις με αντιστάσεις. Η προπόνηση περιελάμβανε την άρση μέτριας έως μεγάλης αντίστασης (50% - 90% της 1 μέγιστης επανάληψης), 2 με 3 φορές την εβδομάδα. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν υγιείς, δεν λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής και δεν ακολουθούσαν κάποια φαρμακευτική αγωγή. Οι οδηγίες των δοκιμαζόμενων ήταν να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες και τη φυσική τους δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της μελέτης, αλλά να απέχουν από την κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης 24 ώρες πριν τη δοκιμή και από φυσική δραστηριότητα 48 ώρες πριν.

2.2 Πειραματική διαδικασία

Οι εθελοντές προσήλθαν στο εργαστήριο μετά από ολονύχτια νηστεία. Απέφυγαν την κατανάλωση καφεΐνης και αλκοόλ 24 ώρες πριν και δεν έκαναν φυσική δραστηριότητα για 48 ώρες πριν τις πειραματικές συνεδρίες. Μετά από ανάπαυση 15 λεπτών σε ύπτια θέση, λήφθηκε το πρώτο δείγμα αίματος μέσω ενός μόνιμου φλεβικού καθετήρα που τοποθετήθηκε στην βραχιόνια φλέβα. Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου, οι δοκιμαζόμενοι έκαναν γενική και ειδική προθέρμανση. Η γενική προθέρμανση η οποία προηγήθηκε της ειδικής περιελάμβανε χαλαρό τρέξιμο και διατάσεις για τα κάτω άκρα. Η ειδική προθέρμανση περιελάμβανε 2 σετ καθισμάτων $\times$ 5 επαναλήψεις στο 60% και στο 80% των 10 RM αντίστοιχα, με 3' διάλειμμα ανάμεσα στα σετ. Ακολούθησαν 3 επαναλήψεις πίεσης της πρέσας, 4' διάλειμμα και 3 επαναλήψεις καθισμάτων. Και οι δύο ασκήσεις πραγματοποιήθηκαν με μέγιστη ταχύτητα κίνησης, για να καθοριστεί η μέγιστη ταχύτητα κίνησης των δύο αυτών ασκήσεων που περιλαμβάνει το πρωτόκολλο, με το φορτίο αυτό των 10 RM. Στη συνέχεια ξεκίνησε το πειραματικό πρωτόκολλο το οποίο περιγράφεται παρακάτω.

Κάθε δοκιμαζόμενος εκτέλεσε ένα πρωτόκολλο ασκήσεων με αντιστάσεις αμέσως μετά την προθέρμανση το οποίο αποτελούνταν από 4 σετ καθίσματα και 4 σετ πιέσεις πρέσας με τα πόδια, με φορτίο αυτό των 10 μέγιστων επαναλήψεων το κάθε σετ και με 3' διάλειμμα μεταξύ των σετ. Το πρώτο πρωτόκολλο περιλάμβανε την εκτέλεση 8 επαναλήψεων ανά σετ με μέγιστη ταχύτητα κίνησης (V_{max}), ενώ το δεύτερο εμπεριείχε τις ίδιες ασκήσεις και σετ στο 70% της μέγιστης δύναμης κίνησης ($70\%V_{max}$). Στην περίπτωση του πρωτοκόλλου με τη μέγιστη δύναμη κίνησης, τα σετ ολοκληρώθηκαν είτε όταν πραγματοποιήθηκε ο απαιτούμενος αριθμός επαναλήψεων, είτε όταν η ταχύτητα κίνησης μειώθηκε κάτω από το 85% της μέγιστης για 2 συνεχόμενες επαναλήψεις (κανένας από τους δοκιμαζόμενους δεν κατάφερε να ολοκληρώσει τον απαιτούμενο αριθμό επαναλήψεων σε όλα τα σετ με μέγιστη ταχύτητα). Οι 5 δοκιμαζόμενοι ξεκίνησαν στις 09:30 και οι υπόλοιποι 6 στις 11:00. Οι λήψεις αίματος πραγματοποιήθηκαν πριν, αμέσως μετά, 20' μετά και 40' μετά το πρόγραμμα άσκησης.

Η προθέρμανση και το τεστ μέγιστης ταχύτητας διήρκεσε 25' και το πρωτόκολλο 34 ± 1 λεπτά. Έτσι η συνολική διάρκεια της συνεδρίας διήρκεσε 60 ± 3 λεπτά. Κατά τη διάρκεια των ασκήσεων με αντιστάσεις η ταχύτητα κίνησης της έκκεντρης συστολής επιλέχθηκε από τους δοκιμαζόμενους, ενώ η ταχύτητα κίνησης της σύγκεντρης συστολής ήταν μέγιστη.

Στο πρωτόκολλο του V_{max} κανένας από τους συμμετέχοντες δεν κατάφερε να ολοκληρώσει τις 8 επαναλήψεις με ταχύτητα κίνησης πάνω από το 85% της μέγιστης και στα 4 σετ των καθισμάτων και των πιέσεων στη πρέσα. Ο μέσος όρος των επαναλήψεων ανά σετ ήταν $7,82\pm 0,28$ (εύρος: 7,25 – 8) για τα καθίσματα και $7,23\pm 0,68$ (εύρος: 6,25 – 8) για τις πιέσεις ποδιών στη πρέσα. Συνολικά, οι δοκιμαζόμενοι ολοκλήρωσαν $60,18\pm 2,52$ από τις 64 επαναλήψεις (εύρος: 55 – 63) στο πρωτόκολλο V_{max} . Κατά τη διάρκεια της άσκησης με την πρέσα, τα φορτία μειώθηκαν κατά 5% για ένα σετ σε 2 δοκιμαζόμενους και για δύο σετ σε έναν. Αυτές οι προσαρμογές πραγματοποιήθηκαν για να εξασφαλιστούν τουλάχιστον 6 επαναλήψεις, οι οποίες είναι οι λιγότερες σε αριθμό που μπορεί να υπάρχουν σε ένα πρωτόκολλο υπερτροφίας με ταχύτητα κίνησης πάνω από το 85% της μέγιστης. Στο πρωτόκολλο του $70\%V_{max}$ όλοι οι εθελοντές κατάφεραν να ολοκληρώσουν τις 8 επαναλήψεις σε όλα τα σετ χωρίς προσαρμογές του φορτίου. Κατά τη διάρκεια της άσκησης οι εθελοντές είχαν τη δυνατότητα να πίνουν νερό κατά βούληση. Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου λήφθηκαν δείγματα αίματος αμέσως μετά την άσκηση (μέσα σε 1' μετά τη λήξη της άσκησης), καθώς επίσης στα 20' και στα 40' της ανάκαμψης. Όλα τα δείγματα αίματος λήφθηκαν με τους εθελοντές σε ύπτια θέση. Η καρδιακή συχνότητα παρακολουθούνταν συνεχόμενα κατά τη διάρκεια της άσκησης (Polar RS400, Polar Electro, Φιλανδία). Οι τιμές της καρδιακής συχνότητας καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια των φάσεων της άσκησης σε κάθε σετ έτσι ώστε να υπολογιστεί η μέση τιμή της καρδιακής συχνότητας στο σύνολο του πρωτοκόλλου.

2.3 Μετρήσεις

2.3.1 Φορτίο των 10 μέγιστων επαναλήψεων (RM)

Τρεις μέρες πριν την έναρξη των προπονήσεων μετρήθηκε το φορτίο των 10 μέγιστων επαναλήψεων. Στην άσκηση των καθισμάτων χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Smith (γωνία γόνατος: $74,3 \pm 5,2^\circ$) και στην άσκηση πιέσεων των ποδιών στη πρέσα χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα πρέσας ποδιών διαγώνια στις 45° . Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες ασκήσεις επειδή ενεργοποιούν μεγάλες μυϊκές ομάδες στο κάτω μέρος του σώματος. Πριν το τεστ των 10 RM (Resistance Maximum), οι δοκιμαζόμενοι εκτέλεσαν την κίνηση του καθίσματος με τους μηρούς παράλληλους σε σχέση με το έδαφος. Έπειτα τους ζητήθηκε να διατηρήσουν αυτή τη θέση έτσι ώστε να σημειωθεί στο μηχάνημα η κατάλληλη θέση της αντίστασης στην συγκεκριμένη γωνία του γόνατος και αμέσως μετά σημείωσαν την ίδια γωνία στο μηχάνημα της πρέσας ποδιών. Κατά τη διάρκεια των καθισμάτων και των πιέσεων στην πρέσα, η κίνηση της καθόδου ελέγχθηκε με μεταλλικά στοπ τα οποία είχαν τοποθετηθεί στα σημεία που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ η κίνηση προς τα πάνω εκτελέστηκε μέχρι την πλήρη έκταση των γονάτων. Για τον προσδιορισμό του βάρους των 10 RM, οι δοκιμαζόμενοι εκτέλεσαν αρχικά 10 επαναλήψεις με ένα ποσοστό βάρους 50% - 60% της 1 μέγιστης τους επανάληψης. Έπειτα το φορτίο αυξανόταν προοδευτικά 5 έως 20 κιλά, κάθε 4 λεπτά έως ότου οι συμμετέχοντες να μην είναι ικανοί να ολοκληρώσουν 10 επαναλήψεις σε όλο το εύρος κίνησης. 3 με 4 σετ απαιτήθηκαν για να προσδιοριστεί το φορτίο των 10 RM.

2.3.2 Μηχανικές παράμετροι

Η κατακόρυφη μετατόπιση της μπάρας κατά τη διάρκεια των καθισμάτων και των πιέσεων στη πρέσα μετρήθηκε ως συνάρτηση του χρόνου με τη βοήθεια ενός γραμμικού κωδικοποιητή (Τεχνολογία Ergotest, Νορβηγία) ο οποίος συνδεόταν με μπάρα με ένα καλώδιο. Όταν η μπάρα μετακινούνταν από τους εθελοντές, μεταδιδόταν ένα σήμα από τον κωδικοποιητή με ανάλυση 0,075 χιλιοστών, σε έναν μετασχηματιστή A/D (muscle lab, τεχνολογία Ergotest, συχνότητα δειγματοληψίας 100Hz) ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με έναν υπολογιστή για την μεταφορά και την ανάλυση των δεδομένων (έκδοση MuscleLab 6,07, τεχνολογία Ergotest). Το εξωτερικό φορτίο εισήχθη μέσα στο λογισμικό και έτσι υπολογίστηκαν μηχανικοί παράμετροι όπως η ταχύτητα και η δύναμη κατά τη διάρκεια της κίνησης. Βασιζόμενο στην συνολική δύναμη και τα δεδομένα που μεταφέρθηκαν,

υπολογίστηκε το συνολικό έργο που εκτελέστηκε σε κάθε συνεδρία άσκησης. Υπήρχαν οπτικές και ακουστικές ενδείξεις που καθοδηγούσαν τους εθελοντές κατά την εκτέλεση των ασκήσεων για την παραγωγή ισχύς ειδικά για το πρωτόκολλο άσκησης που εκτελούνταν εκείνη τη μέρα.

2.3.3 Ανάλυση αίματος

Λήφθηκαν 8 mL αίματος σε κάθε σημείο δειγματοληψίας και εισήχθησαν σε ειδικούς σωλήνες διαχωρισμού του ορού όπου παρέμειναν για 30' μέχρι να πήξουν τα δείγματα και μετά φυγοκεντρήθηκαν σε 1500 στροφές για 15' (Hermle Z300K, Labortechnik, Γερμανία). Οι οροί απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν και καταψύχθηκαν στους -80 °C για περαιτέρω ανάλυση.

2.3.3.1 Αναλύσεις με τη μέθοδο ELISA

Η οστεοκαλσίνη προσδιορίστηκε με την τεχνική ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay). Σύμφωνα με αυτήν τη τεχνική συνδυάζεται η ειδικότητα και η ευαισθησία των αντισωμάτων προκειμένου να ανιχνευτεί και να βρεθεί η συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου – ουσίας προς μελέτη. Συγκεκριμένα, στην πλάκα μικροτιτλοποίησης υπάρχει εξ' αρχής προσδεμένο αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο. Τα δείγματα επωάζονται στην πλάκα και κατόπιν ξεπλένονται οπότε μόνο το υπό μελέτη αντιγόνο μένει προσκολλημένο στην πλάκα επιτρέποντας έτσι τη μελέτη δειγμάτων χωρίς να έχει προηγηθεί ο καθαρισμός τους. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο ELISA kit που ανιχνεύει την οστεοκαλσίνη (Takara, MK118) στον ορό του αίματος. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 450nm.

2.3.3.2 Διαδικασία της μεθόδου ELISA για τον προσδιορισμό της Οστεοκαλσίνης

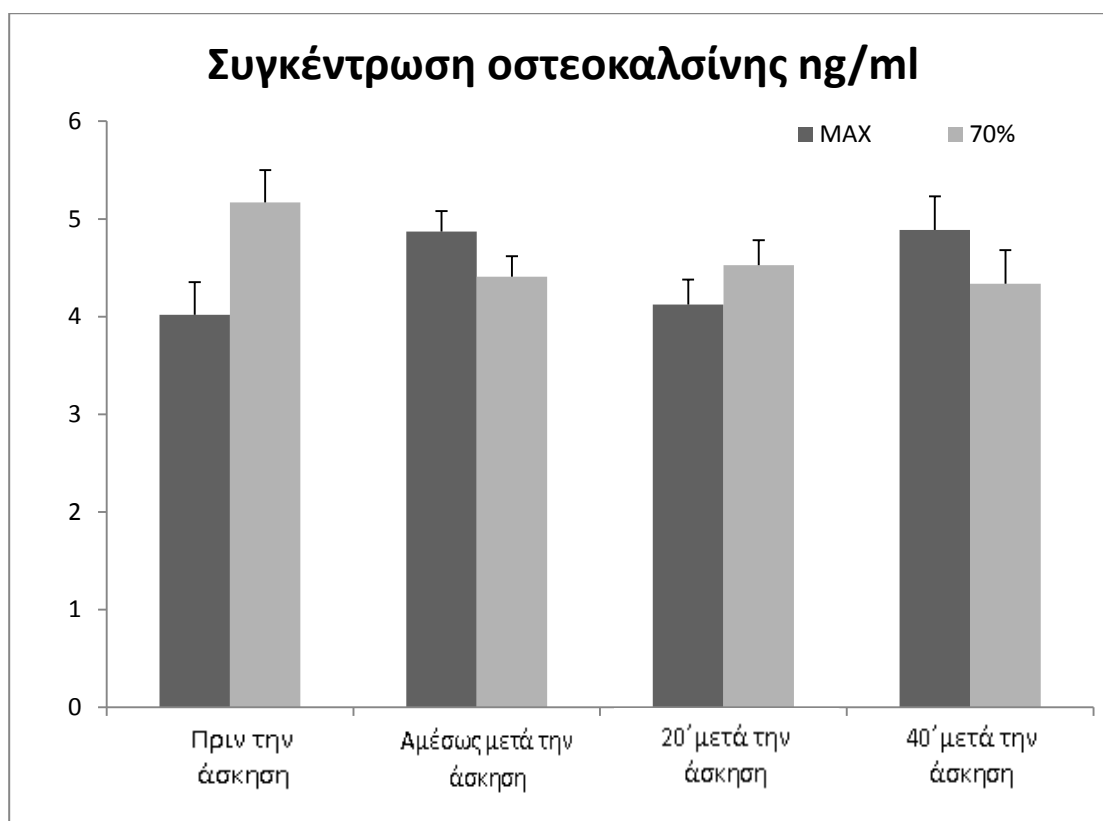
Σε πλακίδια 96 κελιών τα οποία ήταν επιχρισμένα με Στρεπταβιδίνη, τοποθετήθηκαν τα δείγματα των δοκιμαζόμενων και τα standards. Η επώαση διήρκησε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα η στερεά φάση πλύθηκε με αποσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα σημασμένα αντισώματα. Στη συνέχεια προστέθηκε ένα διάλυμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB) το οποίο επώαστηκε για 15 λεπτά στο σκοτάδι, με αποτέλεσμα την εμφάνιση κίτρινου χρώματος. Η ανάπτυξη του κίτρινου χρώματος διακόπηκε με την προσθήκη 100 μ L Stop Solution και το κίτρινο χρώμα που προέκυψε μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 450nm. Η συγκέντρωση της οστεοκαλσίνης είναι ανάλογη προς την ένταση του χρώματος του δείγματος δοκιμής.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Ανάλυση διασποράς επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (One-Way ANOVA with repeated measures) με Tukey's post hoc test χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης. Μη παραμετρική ανάλυση διασποράς επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Friedman test) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των ποσοστιαίων (%) μεταβολών της οστεοκαλσίνης, ενώ Wilcoxon signed-rank test με διόρθωση Bonferroni χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω post hoc ανάλυση των δεδομένων και την ανάδειξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων ποσοστιαίων τιμών.

Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου (S.E.M.). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$, με δίπλευρο έλεγχο. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Statgraphics Centurion XVI.

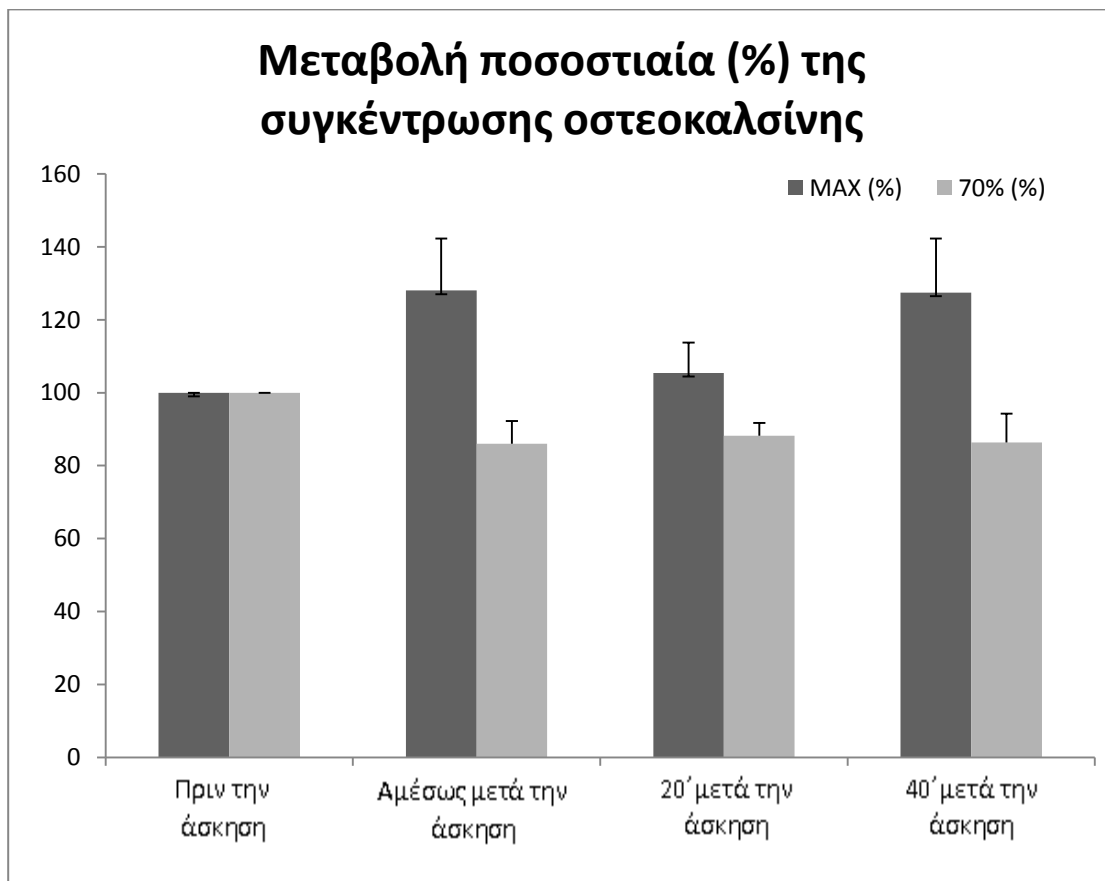
3. Αποτελέσματα



Ραβδόγραμμα 3.1 Η συγκέντρωση της οστεοκαλσίνης στον αίμα των δοκιμαζομένων (Οι κάθετες μαύρες γραμμές να απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.)

Από τα 11 δείγματα ορού αίματος των εθελοντών, η ανάλυση περιλαμβάνει τα 9 λόγω μη επαρκούς ποσότητας δείγματος.

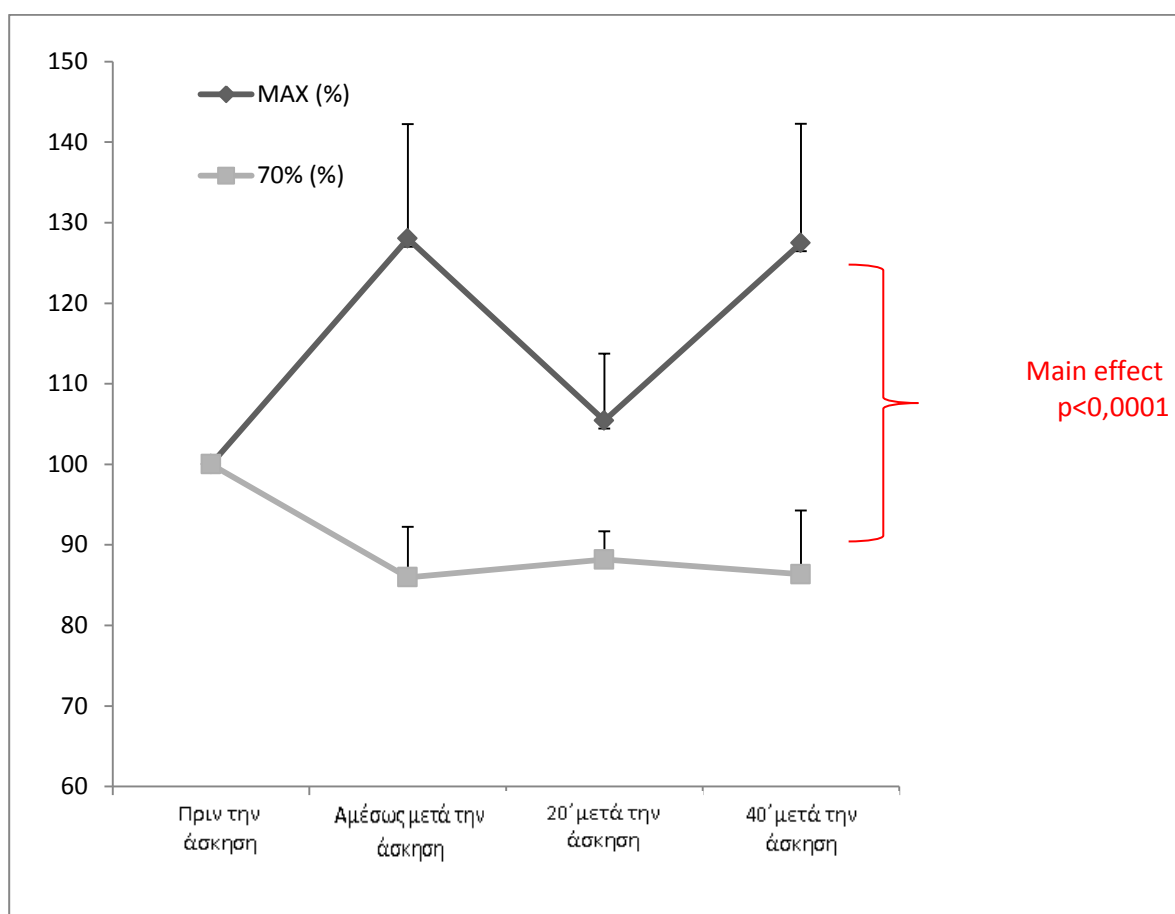
Στην ανάλυση της διασποράς ANOVA (Ραβδόγραμμα 3.1) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης συγκέντρωσης της οστεοκαλσίνης αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ασκήσεων με αντιστάσεις με μέγιστη ταχύτητα κίνησης και 40 λεπτά μετά με $p=0.027$ και $p=0.024$ αντίστοιχα. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στις συγκεντρώσεις της οστεοκαλσίνης στην περίπτωση που οι δοκιμαζόμενοι εκτέλεσαν το πρωτόκολλο στο 70% της μέγιστης ταχύτητας κίνησης αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ασκήσεων με αντιστάσεις και 40 λεπτά έπειτα, με $p=0.027$ και $p=0.016$ αντίστοιχα.



Ραβδόγραμμα 3.2 Οι ποσοστιαίες μεταβολές της οστεοκαλσίνης στο αίμα των δοκιμαζομένων (με τις κάθετες μαύρες γραμμές να απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα).

Ακολούθως, η δοκιμασία ANOVA (Ραβδόγραμμα 3.2) έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσοστιαίας συγκέντρωσης της οστεοκαλσίνης κατά 28 % αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ασκήσεων με αντιστάσεις με μέγιστη ταχύτητα κίνησης ($p=0.019$), αλλά και 40 λεπτά μετά την άσκηση κατά 27 % ($p=0.021$). Παρόμοια εικόνα με τις μεταβολές στη συγκέντρωση σε ng/ml είχαμε και στις εκατοστιαίες μεταβολές των ποσοστιαίων συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης, στην περίπτωση που οι δοκιμαζόμενοι εκτέλεσαν το πρωτόκολλο στο 70% της μέγιστης ταχύτητας κίνησης. Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στις συγκεντρώσεις της οστεοκαλσίνης και σε αυτήν την περίπτωση αμέσως μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ασκήσεων με αντιστάσεις και 40 λεπτά έπειτα, με $p=0.041$ και $p=0.046$ αντίστοιχα.

Τέλος, στις εκατοστιαίες μεταβολές των ποσοστιαίων συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ώρα από άσκηση και ταχύτητα άσκησης, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. Αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ώρα από άσκηση και ταχύτητα άσκησης, όσον αφορά στις εκατοστιαίες μεταβολές των ποσοστιαίων συγκεντρώσεων της οστεοκαλσίνης.

Τα δεδομένα που προήλθαν από την σύγκριση μεταξύ των τιμών της οστεοκαλσίνης δε δείχνουν συσχέτιση βάσει της διαφορετικής χρονικής περιόδου πριν και μετά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ($p>0.05$).

4. Συζήτηση

Η οστεοκαλσίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης στον ορό για το σχηματισμό οστού και πιστεύεται ότι δρα στην εξωκυττάρια ουσία των οστών για να ρυθμίσει την επιμετάλλωση, όμως νέα γενετικά και φαρμακολογικά στοιχεία δίνουν έναν πιο σημαντικό ενδοκρινή ρόλο στην οστεοκαλσίνη (Clemens and Karsenty, 2011, Lee, 2007). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη πειραματική έρευνα αναφορικά με τις μεταβολές της συγκέντρωσης της οστεοκαλσίνης στο αίμα νεαρών ατόμων μετά από προπόνηση με αντιστάσεις. Η πρόσφατη αναγνώριση των ορμονών που προέρχονται από οστά και των υποδοχέων τους επιτρέπει να ελέγξουμε εάν το οστό ρυθμίζει τη λειτουργία των μυών σε κατάσταση ηρεμίας ή και κατά τη διάρκεια της άσκησης. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι αμέσως μετά την έντονη άσκηση σημειώθηκε μεγαλύτερη ποσότητα οστεοκαλσίνης στο αίμα ενώ το ίδιο συμβαίνει και σαράντα λεπτά μετά την έντονη άσκηση. Εν αντιθέσει, η μειωμένης έντασης άσκηση προκαλεί μείωση της οστεοκαλσίνης στο αίμα αμέσως μετά την άσκηση αλλά και αφού περάσουν σαράντα λεπτά. Η αύξηση της οστεοκαλσίνης μετά από έντονη άσκηση αντιστάσεων συμπίπτει με το γεγονός ότι η οστεοκαλσίνη αυξάνεται κατά τη διάρκεια αερόβιας άσκησης (Mera *et al.*, 2016). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη των Novotny *et al.* (2015) αναφορικά με την αλληλεπίδραση οστού και μυών και την άποψη των Partridge and Gems (2002) ότι η οστεοκαλσίνη μπορεί να συσχετίζεται με τη ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών όπως η μυϊκή λειτουργία κατά την άσκηση. Ακόμη το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης αποτελεί ένδειξη ρύθμισης της μυϊκής λειτουργίας από το οστό τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και κατά την έντονη άσκηση.

Γενικά η άσκηση με αντιστάσεις βελτιώνει το επίπεδο της οστικής πυκνότητας και η αύξηση της μυϊκής μάζας ευνοεί την ανάπτυξη της οστικής μάζας. Ωστόσο, η ένταση, το μέγεθος και η συχνότητα με την οποία εφαρμόζεται η δύναμη έχει επιπτώσεις στη λειτουργία των οστεοβλαστών που είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την αύξηση των οστών. (Mc Ardle & Katch, 1986). Η οστεοκαλσίνη συντίθεται και εκκρίνεται αποκλειστικά από τα οστεοβλαστικά κύτταρα στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης (Clemens and Karsenty, 2011, Lee, 2007). Το γεγονός ότι η οστεοκαλσίνη αυξήθηκε μετά την έντονη άσκηση και μειώθηκε μετά την πιο χαμηλής έντασης άσκηση ενισχύει την θεωρία που θέλει την ένταση της άσκησης αντιστάσεων να επιδρά στη λειτουργία των οστεοβλαστών αφού επιδρά στην

παραγόμενη από αυτούς οστεοκαλσίνη. Πιθανόν λοιπόν οι οστεοβλάστες με έντονη άσκηση αντιστάσεων να λαμβάνουν το ερέθισμα για παραγωγή περισσότερης οστεοκαλσίνης, η οποία οδηγεί στην αύξηση της μυϊκής αλλά και της οστικής μάζας. Η ρύθμιση της φυσιολογίας του μυϊκού ιστού από την οστεοκαλσίνη ενισχύεται και από άλλες μελέτες. Ο Mera *et al.* (2016) διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της βιοδραστικής οστεοκαλσίνης στο αίμα μειώνονται ραγδαία και απότομα στη διάρκεια ζωής σε ποντίκια, πιθήκους και ανθρώπους. Η σηματοδότηση της οστεοκαλσίνης στις μυϊκές ίνες είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μυϊκής μάζας σε γηραιότερους ποντικούς επειδή προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών στα μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον η εξωγενής οστεοκαλσίνη είναι επαρκής για την αύξηση της μυϊκής μάζας σε ποντίκια ηλικίας 10 μηνών (Mera *et al.* 2016).

Η παρούσα πειραματική εργασία ήταν η πρώτη που μελέτησε τα επίπεδα της οστεοκαλσίνης στο αίμα μετά από προπόνηση αντιστάσεων, για αυτό και τα αποτελέσματα της ήταν δύσκολο να συγκριθούν με άλλες μελέτες για ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτό το λόγο στο μέλλον είναι ανάγκη να γίνουν μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών και με διαφορετικά πρωτόκολλα ασκήσης με αντιστάσεις συμπεριλαμβανομένων του διαφορετικού αριθμού επαναλήψεων και σετ, της ταχύτητας κίνησης, του χρόνου διαλείμματος ανά σετ, της υψηλής έναντι χαμηλής έντασης, καθώς και η συσχέτιση της οστεοκαλσίνης με άλλες ορμόνες.

5. Βιβλιογραφία

- Accili, D., Arden, K., C., 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 117:421–426.
- Allan, E., H, Ho, P., W, Umezawa, A., et al 2003. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem*. 90:158-169.
- Andersen, T., L., Sondergaard, T., E., Skorzynska, K., E., 2009. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol*. 174 (1):239–247.
- Anderson, H., C., 2003. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 5(3):222–226.
- Arana-Chavez, V., E., Soares, A., and Katchburian, E., 1995. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 58 (3):285–292.
- Baechle, T., R and R., W., 1989. Earle Weight Training: A text written for the college student. Omaha, NB: Creighton University.
- Bass, S., L., 2000. The prepubertal years: A uniquely opportune stage of growth when the skeleton is most responsive of exercise? *Sports Med*. 30:73-78.
- Basu, R., Peterson, J., Rizza, R., Khosla, S. 2011. Effects of physiological variations in circulating insulin levels on bone turnover in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 96: 1450–1455.
- Boivin, G., and Meunier, P., J., 2002. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcified Tissue Int*. 70(6): 503–511.
- Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., et al. 2008. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*. 43(3):532–538.
- Bolton, J., G., Patel, S., Lacey, J., H., White, S., A., 2005. Prospective study of changes in bone turnover and bone density associated with regaining weight in women with anorexia nervosa. *Osteoporosi Int*. 16:1955–1962.
- Bonewald, L., 2006. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 6:331-333.

- Bonewald, L., F., 2011. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 26(2):229–238.
- Boskey, A., L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S., B., Ducy, P., and Karsenty, G., 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 23:187–196.
- Boudreaux, J., M., and Towler, D., A., 1996. Synergistic induction of osteocalcin gene expression. *J. Biol. Chem.* 271:7508-7515.
- Bozec, A., Bakiri, L., Jimenez, M., Rosen, E., D., Catala-Lehnen, P., Schinke, T., et al. 2013. Osteoblast-specific expression of Fra-2/AP-1 controls adiponectin and osteocalcin expression and affects metabolism. *J Cell Sci.* 126:5432–5440.
- Bozec, A., Bakiri, L., Jimenez, M., Schinke, T., Amling, M., Wagner, E., F., 2010. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production. *J Cell Biol.* 190:1093–10106.
- Bronckers, A., L., Price, P., A., Schrijvers, A., Bervoets, T., J., Karsenty, G., 1998. Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. *Eur J Oral Sci.* 106:795–807.
- Bross, R., Storer, T., and Bhasin, S., 1999. Aging and muscle loss. *Trends Endocrinol Metab.* 10(5):194-198.
- Buckwalter, J., A., Glimcher, M., J., Cooper, R., R., and Recker, R., 1996. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 45:371–386.
- Buo, A., M., and Stains, J., P., 2014. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Lett.* 588(8):1315–1321.
- Caglar, G., S., Ozdemir, E., D., Kiseli, M., Demirtas, S., Cengiz, S., D., 2014. The association of osteocalcin and adiponectin with glucose metabolism in nondiabetic postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 77:255–260.
- Capulli, M., Paone, R., and Rucci, N., 2014. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 561:3–12.
- Celeste, A., J., Rosen, V., Buecker, J., L., Kriz, R., Wang, E., A., and Wozney, J., M., 1986. *EMBO J.* 5:1885-1890.
- Cerri, P., S., 2005. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec.* 286(1):833–840.

- Chen, X., Wu, Y., Liu, L., Tian, H., and Yu, X., 2014. Osteocalcin is inversely associated with glucose levels in middle-aged Tibetan men with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Metab Res Rev.* 30:476–482.
- Chin, K., Y., Ima-Nirwana, S., Mohamed, IN., Ahmad, F., Ramli, ES., Aminuddin. A., et al. 2014. Serum osteocalcin is significantly related to indices of obesity and lipid profile in Malaysian men. *Int J Med Sci.* 11:151–157.
- Chorev, M., and Rosenblatt, M., 1996. Principles of Bone Biology (Bilezikian, J. P. Raisz, L. G., and Rodan, G. A., eds). Academic Press Inc San Diego. :305-323.
- Chung, J., H., Hwang, H., J., Han, C., H., Son, B., S., Kim, H., and Park, M., S., 2015. Association between sarcopenia and metabolic syndrome in chronic obstructive pulmonary disease: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (Knhanes) from 2008 to 2011. *COPD.* 12 (1):82-89.
- Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 (3):131–139.
- Clemens, T., L., and Karsenty, G., 2011. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res.* 26:677–680.
- Clemmensen, C., Smajilovic, S., Wellendorph, P., and Brauner-Osborne, H., 2014. The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPC6A) receptor: from cloning to physiological function. *Br J Pharmacol.* 171: 1129–1141.
- Cole, R., E., 2008. Improving clinical decisions for women at risk of osteoporosis: dual-femur bone mineral density testing. *J Am Osteopath Assoc.* 108 (6): 289–295.
- Conigrave, A., D., and Hampson, D., R., 2006. Broad-spectrum L-amino acid sensing by class 3G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 17:398–407.
- Conigrave, A., D., and Hampson, D., R., 2010. Broad-spectrum amino acid-sensing class C G-protein coupled receptors: molecular mechanisms, physiological significance and options for drug development. *Pharmacol Ther.* 127:252–260.
- Cousin, W., Courseaux, A., Ladoux, A., Dani, C., and Peraldi, P., 2004. Cloning of hOST-PTP: the only example of a protein-tyrosine-phosphatase the function of which has been lost between rodent and human. *Biochem Biophys Res Commun.* 321:259–265.
- Crockett, J., C., Mellis, D., J., Scott, D., I., and Helfrich, M., H., 2011. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare

genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Arch Osteoporos* 22 (1):1–20.

- Cui, R., Su, B., Sheng, C., Cheng, X., Yang, P., Bu, L., et al. 2014. Total osteocalcin in serum predicts testosterone level in male type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med*. 7:1145–1149.
- Dallas, K., Prideaux, S., L., and Bonewald, L., F., 2013. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*. 34 (5):658–690.
- Damoulis, P., D., and Hauschka, P., V., 1997. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 12 (3):412–422.
- Das, S., K., Elbein, S., C., 2007. The search for type 2 diabetes susceptibility loci: the chromosome 1q story. *Curr Diab Rep*. 7:154–164.
- Das, S., K., Sharma, N., K., and Elbein, S., C., 2010. Analysis of osteocalcin as a candidate gene for type 2 diabetes (T2D) and intermediate traits in Caucasians and African Americans. *Dis Markers*. 28:281–286.
- Datta, H., K., Ng, W., F., Walker, J., A., Tuck, S., P., and Varanasi, S., S., 2008. The cell biology of bone metabolism. *Am J Clin Pathol*. 61 (5):577–587.
- Delibegovic, M., Bence, K., K., Mody, N., Hong, E., G., Ko, H., J., Kim, J., K., et al. 2007. Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell Biol*. 27:7727–7734.
- Delibegovic, M., Zimmer, D., Kauffman, C., Rak, K., Hong, E., G., Cho, Y., R., et al. 2009. Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*. 58:590–599.
- Dempster, D., W., 2006. Anatomy and Functions of the Adult Skeleton. In *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Sixth edition, ASBMR, Washington DC. :7-11.
- Desbois, C., Hogue, D., A., Karsenty, G., 1994. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem*. 269:1183–1190.
- Dook, J., E., Henderson, J., C., and Price, R., I., 1997. Exercise and bone mineral density in mature female athletes. *Med. Sci. Sports Exerc*. 29(3):291-296.

- Downey, P., A., and Siegel, M., I., 2006. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* 86(1):77–91.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A., F., Beil, F., T., et al. 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 100:197–207.
- Ducy, P., and Karsenty, G., 1996. Principles of Bone Biology (Bilezikian, P., Raisz, L. G., and Rodan, G. A., eds). Academic Press Inc. San Diego :183-195.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., et al. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 382:448–452.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A., L., and Karsenty, G., 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89(5):747–754.
- Elloit, D., L., Goldberg, L., and Watts, W., J., 1984. Resistance exercise and plasma beta-endorphin/beta lipotrophin immunoreactivity. *Life Sci* (35):515-518.
- Engelke, J., A., Hale, J., E., Suttie, J., W., and Price, P., A., 1991. Vitamin K-dependent carboxylase: utilization of decarboxylated bone Gla protein and matrix Gla protein as substrates. *Biochim Biophys Acta.* 1078:31–34.
- Esen, E., Chen, J., Karner, C., M., Okunade, A., L., Patterson, B., W., and Long, F., 2013. WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell Metab.* 17:745–755.
- Everts, V., Delaissie, J., M., and Korper, W., 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17 (1):77–90.
- Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., Buchet, R., and Magne, D., 2013. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells.* 5(4):136–148.
- Feng, X., and McDonald, J., M., 2011. Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol.* 6:121-145.
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and Ducy, P., 2008. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5266–5270.
- Ferron, M., Lacombe, J., Germain, A., Oury, F., Karsenty, G., 2015. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. *J Cell Biol.* 208:761–776.

- Ferron, M., McKee, M., D., Levine, R., L., Ducy, P., and Karsenty, G., 2011. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*. 50:568–575.
- Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R., A., Teti, A., et al. 2010. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 142: 296–308.
- Finkelstein, J., S., 1996. Principles of Bone Biology (Bilezikian, J. P., Raisz, G., and Rodan, G. A., eds), Academic Press Inc. San Diego. :993-1005,
- Flenniken, A., M., Osborne, L., R., Anderson, N., et al. 2005. A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Develop*. 132(19):4375–4386.
- Florencio-Silva, R., da Silva Sasso, G., R., Cerri, E., S., Simões, M., J., and Cerri. P., S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* :17.
- Frankling, B., A., 1988. Normal cardiorespiratory responses to acute exercise in J L Roitman American College of sports medicine resource manual for guide lines for exercise testing and prescription. :137-145.
- Frey, J., L., Li, Z., Ellis, J. M., Zhang, Q., Farber, C., R., Aja, S., et al. 2015. Wnt-Lrp5 signaling regulates fatty acid metabolism in the osteoblast. *Mol Cell Biol* 35:1979–1991.
- Frost, H., M., 1969. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Int*. 3(1):211–237.
- Frost, H., M., 1997. Why do marathon runners have less bone than weight lifters. A vital-biomechanical view and explanation. *Bone*. 20 (3):183-189.
- Fukumoto, S., and Martin, T., J., 2009. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 20 (5):230–236.
- Fulzele, K., Di Girolamo, D., J., Liu, Z., Xu, J., Messina, J., L., and Clemens, T., L., 2007. Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signaling and action. *J Biol Chem*. 282:25649–25658.
- Fulzele, K., Riddle, R., C., DiGirolamo, D., J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., et al. 2010. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*. 142:309–319.

- Furie, B., and Furie, B., C., 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 53:505–518.
- Giacomelli, F., Marciano, R., Pistorio, A., et al. 2004. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomic*. 20:87.
- Glass, I., I., Bialek, D., A., Ahn, P., et al. 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 8 (5): 751–764.
- Glimcher, M., J., Disease, M., J., Glimcher, Ed., 1988. The nature of the mineral phase in bone. In: *Metabolic Bone*. Academic Press. San Diego. Calif, USA :23–50.
- Gower, B., A., Pollock, N., K., Casazza. K., Clemens, T., L., Goree, L., L., and Granger W., M., 2013. Associations of total and undercarboxylated osteocalcin with peripheral and hepatic insulin sensitivity and beta-cell function in overweight adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:1173–1180.
- Granhed, K., Jonson, R., and Hansson, T., 1987. The loads on the lum-bar spine during extreme weight lifting. *Spine*. 12 (2):146-149.
- Grigoriadis, A., E., Heersche, J., N., M., and Aubin, J., E., 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol*. 106 (6):2139–2151.
- Gundberg, C., M., and Clough, M., E., 1992. The osteocalcin propeptide is not secreted *in vivo* or *in vitro*. *J Bone Miner Res*. 7:73–80.
- Guyton, A., C., 1998. *Human Physiology and Mechanisms of Disease*. 5th et. Litsas medical edition, Athens.
- Hamidouche, Z., O., Fromigue, O., Nuber, U., et al., 2010. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 224 (2): 509–515.
- Hassan, M., Q., Maeda, Y., Taipaleenmaki, H., et al. 2012. MiR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J Biol Chem*. 287 (50):42084–42092.
- Hauge, E., M., Qvesel, D., Eriksen, E., F., Mosekilde, L., and Melsen, F., 2001. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*. 16 (9):1575–1582.
- Hauschka, P., V., and Carr, S., A., 1982. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochem*. 21:2538–2547.

- Hauschka, P., V., Lian, J., B., Cole, D., E., and Gundberg, C., M., 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 69:990–1047.
- Heinrichs, A., A., Banerjee, C., Bortell, R., Owen, T., A., Stein, J., L., Stein, G., S., and Lian, J., B., 1993. Identification and characterization of two proximal elements in the rat osteocalcin gene promoter that may confer species-specific regulation. *J. Cell. Biochem.* 53:240-250.
- Hill, H., S., Grams, J., Walton, R., G., Liu, J., Moellering, D., R., Garvey, W., T., 2014. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm Metab Res.* 46:341–347.
- Hoang, Q., Q., Sicheri, F., Howard, A., J., and Yang, D., S., 2003. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 425:977–980.
- Hu, H., Hilton, M., J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D., M., and Long, F., 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development.* 132 (1):49–60.
- Hunter, G., K., Hauschka, P., V., Poole, A., R., Rosenberg, L., C., and Goldberg, A., 1996. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* 317: 59-64.
- Hwang, Y., C., Jee, J., H., Jeong, I., K., Ahn, K., J., Chung, H., Y., and Lee, M., K., 2012. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. *Diab. Care.* 35:1919–1924.
- Hwang, Y., C., Jeong, I., K., Ahn, K., J., and Chung, H., Y., 2009. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 25:768–772.
- Jack, H., David, W., and Costill, L., 1994. *Physiology of sport and exercise.*
- Janssen, I., Ross, R., 2005. Linking age-related changes in skeletal muscle mass and composition with metabolism and disease. *J Nutr Health Aging.* 9 (6):408-419.
- Jilka, R., L., Weinstein, R., S., Bellido, T., Parfitt, A., M., and Manolagas, S., C., 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 13 (5):793–802.

- Jobert, A., S., Zhang, P., Couvineau, A., Bonaventure, J., Roume, J., Le Merrer, M., and Silve, C., 1998 J. Clin. Invest. 102:34-40.
- Junqueira, L., C., Cameiro, J., and Kelley, O., R., 1991. Βασική Ιστολογία. Αθήνα.
- Juppner, H., Abou-Samra, A., B., Freeman, M., Kong, X., F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L., F., Jr., Hock, J., Potts, J., T., Kronenberg, M., and Segre, G., V., 1991. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. Science. 254:1024-1026.
- Kajimura, D., Lee, H., W., Riley, K., J., Arteaga-Solis, E., Ferron, M., Zhou, B., et al. 2013. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. Cell Metab. 17:901-15.
- Kanazawa, I., Tanaka, K., Ogawa, N., Yamauchi, M., Yamaguchi, T., and Sugimoto, T., 2013. Undercarboxylated osteocalcin is positively associated with free testosterone in male patients with type 2 diabetes mellitus. Osteoporos Int. 24:1115-1119.
- Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G., and Delany, A., M., 2010. MiR-29modulatesWnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. J Biol Chem. 285 (33):25221-25231.
- Karsenty, G., and Ferron, M., 2012. The contribution of bone to whole-organism physiology. Nature. 481:314-320.
- Karsenty, G., and Olson, E., N., 2016. Bone and muscle endocrine functions: unexpected paradigms of inter-organ communication. Cell. 164 (6):1248-1256.
- Karsenty, G., and Oury, F., 2014. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. Mol Cell Endocrinol. 382:521-526.
- Karsenty, G., Kronenberg, H., M., and Settembre, C., 2009. Genetic control of bone formation. Annu Rev Cell Dev Bio. 25:629-648.
- Khosla, S., Oursler, M., J., and Monroe, D., G., 2012. Estrogen and the skeleton. Trends Endocrinol Metab. 23 (11):576-581.
- Kim, G., S, Lee, J., Y, Im, J., A., Kim, D., W., Lee, H., S, Kim, S., H., et al. 2013. Association between serum osteocalcin and insulin resistance in postmenopausal, but not premenopausal, women in Korea. Menopause. 20:1061-1066.
- Kim, G., S., Jekal, Y., Kim, H., S., Im, J., A., Park, J., Y., and Chu, S., H., 2014. Reduced serum total osteocalcin is associated with central obesity in Korean children. Obes Res Clin Pract. 8: 201-298.

- Kim, Y., S., Nam, J., S., Yeo, D., W., Kim, K., R., Suh, S., H., and Ahn, C., W., 2015. The effects of aerobic exercise training on serum osteocalcin, adipocytokines, and insulin resistance on obese young males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 82:686–694.
- Kindblom, J., M., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Karlsson, M., K., Tivesten, A., Smith, U., et al. 2009. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 24:785–791.
- Kirmani, S., Atkinson, E., J., Melton, L., J., Riggs, B., L., Amin, S., and Khosla S., 2011. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res*. 26: 2212–2216.
- Kode, A., Mosialou, I., Silva, B., C., Joshi, S., Ferron, M., Rached, M., T., et al. 2012. FoxO1 protein cooperates with ATF4 protein in osteoblasts to control glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 287:8757–8768.
- Komori, T., Yagi, H., and Nomura, S., 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89 (5):755–764.
- Korostishevsky, M., Malkin, I., Trofimov, S., Pei, Y., Deng, H., W., and Livshits, G., 2012. Significant association between body composition phenotypes and the osteocalcin genomic region in normative human population. *Bone*. 51:688–694.
- Krolner, B., and Toft, B., 1983. Vertebral bone loss: An unheeded side effect of therapeutic bed rest. *Clin. Sci*. 64:537-540.
- Kuang, D., Yao, Y., Lam, J., Tsushima, R., G., and Hampson, D., R., 2005. Cloning and characterization of a family C orphan G-protein coupled receptor. *J Neurochem*. 93:383–391.
- Kumar, R., Binkley, N., and Vella, A., 2010. Effect of phylloquinone supplementation on glucose homeostasis in humans. *Am J Clin Nutr*. 92:1528–1532.
- Laize, V., Martel, P., Viegas, C., S., Price, P., A., and Cancela, M., L., 2005. Evolution of matrix and bone gamma-carboxyglutamic acid proteins in vertebrates. *J Biol Chem*. 280: 26659–26668.
- Lee, N., K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J., D., Confavreux, C., et al 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 130:456–469.

- Levinger, I., Jerums, G., Stepto, N., K., Parker, L., Serpiello, F., R., McConell, G., K., et al. 2014. The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin and insulin sensitivity in obese men. *J Bone Miner Res* 29:2571–2576.
- Levinger, I., Scott, D., Nicholson, G., C., Stuart, A., L., Duque, G., McCorquodale, T., et al. 2014. Undercarboxylated osteocalcin, muscle strength and indices of bone health in older women. *Bone*. 64:8–12.
- Lian, J., B., and Gundberg C., M., 1988. Osteocalcin. In: *Clin orthop rel res*. 226:267-291.
- Lian, J., B., Shalhoub, V., Aslam, F., Frenkel, B., Green, J., Hamrah, M., Stein, S., and Stein, J., L., 1997. Species-specific glucocorticoid and 1,25 -dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinol*. 138:2117-2127.
- Liatis, S., Sfikakis, P., P., Tsiakou, A., Stathi, C., Terpos, E., Katsilambros, N., et al 2014. Baseline osteocalcin levels and incident diabetes in a 3-year prospective study of high-risk individuals. *Diabetes Metab*. 40:198–203.
- Liu, F., Malaval, L., and Aubin, J., E., 1997. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp.Cell Res*. 232:97-105.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M., D., Pinero, G., J., Loyer, E., Behringer, R., R., et al. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 386:78–81.
- Manolagas, S., C., 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 21(2):115–137.
- Manolagas, S., C., Kousteni, S., and Jilka, R., L., 2002. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*. 57:385–409.
- Marks, S., C., and Popoff, S., N., 1988. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 183 (1):1–44.
- Matkovic, V., 1996. Skeletal development and bone turnover revisited. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 2013-2016.
- Matsuo, K., and Irie, N., 2008. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 473 (2):201–209.

- Mera, P., Laue, K., Ferron, M., Confavreux, C., Wei, J., Galán-Díez, M., et al 2016. Osteocalcin signaling in myofibers is necessary and sufficient for optimum adaptation to exercise. *Cell Metabol.* 23 (6):1078-1092.
- Mizokami, A., Yasutake, Y., Gao, J., Matsuda, M., Takahashi, I., Takeuchi, H., et al 2013. Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One.* 8:573-575.
- Mizokami, A., Yasutake, Y., Higashi, S., Kawakubo-Yasukochi, T., Chishaki, S., Takahashi, I., et al 2014. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone.* 69:68–79.
- Montero, A. Y., Okada, Y., Tomita, M. et al., 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 105 (8):1085–1093.
- Mori, K., Emoto, M., Motoyama, K., Lee, E., Yamada, S., Morioka, T., et al 2012. Undercarboxylated osteocalcin does not correlate with insulin resistance as assessed by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*, 4:53.
- Morris, D., P., Stevens, R., D., Wright, D., J., and Stafford, D., W., 1995. Processive post-translational modification. Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. *J Biol Chem.* 270:30491–30498.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M., D., and Karsenty, G., 2004. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two Gla-containing proteins. *J Cell Biol.* 165:625–30.
- Nakashima, K., Zhou, X., and Kunkel, G., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108(1):17–29.
- Newberry, E., P., Boudreaux, J., M., and Towler, D., A., 1996. The rat osteocalcin fibroblast growth factor (FGF)-responsive element: an okadaic acid-sensitive, FGF-selective transcriptional response motif. *Mol. Endocrinol.* 10: 1029-1040.
- Nikel, O., Laurencin, D., McCallum, S., A., Gundberg, C., M., and Vashishth, D. 2013. Investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic–inorganic interface in bone. *J. Am. Chem. Soc.* 29:13873–13882.
- Nilsson, B., E., and N., E., Westlin. 1971. Bone density in athletics. *Clin. Orthoped.* 77:179-182.

- Novotny, S., A., Warren, G., L., and Hamrick, M., W., 2015. Aging and the muscle-bone relationship. *Physiol.* 30(1):8-16.
- Nussbaum, M., Baird, D., Sonnenblick, M., Cowan, K., and Shenker, I., R., 1985. Short stature in anorexia nervosa patients. *J Adolesc Health Care.* 6:453–455.
- Onyia, J., E., Bidwell, J., Herring, J., Hulman, J., and Hock, J., M., 1995. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1–34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 17: 479-484.
- Oury, F., Ferron, M., Huizhen, W., Confavreux, C., Xu, L., Lacombe, J., et al. 2013. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas–bone–testis axis. *J Clin Invest.* 123:2421–2433.
- Oury, F., Ferron, M., Huizhen, W., Confavreux, C., Xu, L., Lacombe, J., et al., 2013. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest.* 123(6):2421-2433.
- Oury, F., Khrimian, L., Denny, C., A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., et al. 2013. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell.* 155:228–241.
- Oury, F., Khrimian, L., Denny, C., A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., et al. 2013. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell.* 155(1):228-241.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C., E., et al. 2011. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 144:796–809.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C., E., et al. 2011. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 144(5): 796-809.
- Parfitt, A., M., 1990. Bone-forming cells in clinical conditions. *Bone.* (1):351–429.
- Patarca, R., Saavedra, R., A., and Cantor, H., 1993. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol.* 13:225-246.
- Patterson-Buckendahl, P., Sowinska, A., Yee, S., Patel, D., Pagkalinawan, S., Shahid, M., et al. 2012. Decreased sensory responses in osteocalcin null mutant mice imply neuropeptide function. *Cell Mol Neurobiol.* 32:879–889.
- Paulussen, M., Frohlich, B., and Jurgens, H., 2001. Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs.* 3(12): 899-913.

- Petrucci, M., Paquette, Y., Leblond, F., A., Pichette, V., and Bonnardeaux, A., 2006. Evidence that the mouse osteocalcin-related gene does not encode nephrocalcin. *Nephron Exp Nephrol.* 104:140–146.
- Phan, T., C., A., Xu, J., and Zheng, M., H., 2004. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol.* 19(4):1325–1344.
- Pi, M., Chen, L., Huang, M., Z., Zhu, W., Ringhofer, B., Luo, J., et al. 2008. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *Plos One.* 3:38-58.
- Pi, M., Faber, P., Ekema, G., Jackson, P., D., Ting, A., Wang, N., et al. 2005. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* 280: 40201-40209.
- Pi, M., Wu, Y., and Quarles, L., D., 2011. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in beta-cells in vitro and pancreas in vivo. *J Bone Miner Res.* 26:1680–1683.
- Pi, M., Zhang, L., Lei, S., F., Huang, M., Z., Zhu, W., Zhang, J., et al. 2010. Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice. *J Bone Miner Res.* 25:1092–102.
- Pocock, N., A., Eisman, J., Gwinn, T., Sambrook, P., Kelley, P., Freund, J., and Yeates, M., 1989. Muscle strength, physical fitness and weight but not age to predict femoral neck bone mass. *J Bone Miner. Res.* 4(3):441-448.
- Poundarik, A., A., Diab, T., Sroga, G., E., Ural, A., Boskey, A., L., Gundberg, C., M., et al. 2012. Dilatational band formation in bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:19178–19183.
- Price, P., A., Williamson, M., K., Haba, T., Dell, R., B., and Jee, W., S., 1982. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79:7734–7738.
- Price, P., A., and Williamson, M., K., 1985. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem.* 260:14971–14975.
- Price, P., A., Otsuka, A., A., Poser, J., W., Kristaponis, J., and Raman, N., 1976. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:1447–1451.
- Price, P., A., Pathermore, L., G., and Deftos, L., J., 1980. New biochemical marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone GLA Protein in the plasma for normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest.* 66: 878-883.

- Price, P., A., Poser, J., W., and Raman, N., 1976. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73: 3374–3375.
- Price, P., A., Urist, M., R., and Otawara, Y., 1983. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 117:765–771.
- Puchacz, E., Lian, J., B., Stein, G., S., Wozney, J., Huebner, K., and Croce, C., 1989. Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinol*. 124:2648–2650.
- Qu, Q., Perala-Heape, M., Kapanen, A., Dahllund, J., Salo, J., Vaananen, K., and Harkonen, P., 1998. *Bone*. 22:201-209.
- Rached, M., T., Kode, A., Silva, B., C., Jung, D., Y., Gray, S., Ong, H., et al. 2010. FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. *J Clin Invest*. 120:357–368.
- Raisz, L., G., and Rodan, G., A., L., V., Avioli and S., M., Krane, Eds., 1998. Embryology and cellular biology of bone. In: *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*, Academic Press, New York, NY, USA. (3):1–22.
- Regan, J., N., Lim, J., Shi, Y., Joeng, K., S., Arbeit, J., M., Shohet, R., V., et al. 2014. Up-regulation of glyco-lytic metabolism is required for HIF1alpha-driven bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111:8673–8678.
- Reinehr, T., and Roth, C., L., 2010. A new link between skeleton, obesity and insulin resistance: relationships between osteocalcin, leptin and insulin resistance in obese children before and after weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 34:852–858.
- Rice, J., S., Williamson, M., K., and Price, P., A., 1994. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from the calcified cartilage of the soupfin shark. *J Bone Miner Res*. 9:567–576.
- Riddle, R., C., Frey, J., L., Tomlinson, R., E., Ferron, M., Li, Y., Di Girolamo, D., J., et al. 2014. Tsc2 is a molecular checkpoint controlling osteoblast development and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol*. 34:1850–1862.
- Ritter, N., M., Farach-Carson, M., C., and Butler, W., T., 1992. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *J Bone Miner Res*. 7:877–885.

- Robling, A., G., Castillo, A., B., and Turner, C., H., 2006. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 8:455–498.
- Sarkar, P., D., and Choudhury, A., B., 2013. Relationships between serum osteocalcin levels versus blood glucose, insulin resistance and markers of systemic inflammation in central Indian type 2 diabetic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17:1631–1635.
- Schafer, A., L., Sellmeyer, D., E., Schwartz, A., V., Rosen, C., J., Vittinghoff, E., Palermo, L., et al. 2011. Change in undercarboxylated osteocalcin is associated with changes in body weight, fat mass, and adiponectin: parathyroid hormone (1–84) or alendronate therapy in postmenopausal women with osteoporosis (the PaTH study). *J Clin Endocrinol Metab.* 96:1982–1989.
- Schipani, E., Langman, C., B., Parfitt, A., M., Jensen, G., S., Kikuchi, S., Kooh, W., Cole, W., G., and Juppner, H., 1996. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen’s metaphyseal chondrodysplasia. *N. Engl. J. Med.* 335:708 -714.
- Schwartz, Z., Semba, S., Graves, D., Dean, D., D., Sylvia, V., L., Boyan, B., D., 1997. Rapid and long term effects of PTH (1-34) on growth plate chondrocytes are mediated through two different pathways in a cell-maturation-dependent manner. *Bone.* 21:249-259.
- Schwartz, A., V., Schafer, A., L., Grey, A., Vittinghoff, E., Palermo, L., Lui, L., Y., et al. 2013. Effects of antiresorptive therapies on glucose metabolism: results from the fit, horizon-pft, and freedom trials. *J Bone Miner Res.* 28:1348–1354.
- Sharkey, B., and Gaskill, S., 2016. Άσκηση και Υγεία. 7^η έκδοση.
- Shiba, S., Ikeda, K., Azuma, K., Hasegawa, T., Amizuka, N., Horie-Inoue, K. et al. 2014. Gamma-glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 453:350–355.
- Sims, N., A., and Gooi, J., H., 2008. “Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 19 (5):444–451.
- Skerry, T., M., 1997. Mechanical loading and bone: What sort of exercise is beneficial to the skeleton? *Bone.* 20 (3):179-181.

- Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F., P., Villa, A., And Helfrich, M., H., 2013. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol.* 9 (9):522–536.
- Sommerfeldt, D., W., 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 10:86-95.
- Stafford, D., W., 2005. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost.* 3:1873–1878.
- Stein, G., S., Lian, J., B., Stein, J., L., van Wijnen, A., J., and Montecino, M., 1996. *Physiol. Rev.* 76:593-629.
- Stein, G., S., van Wijnen, A., J., Stein, J., L., and Lian, J., B., 1998. *Front. Biosci.* 3:849-864.
- Sunnerhagen, M., Drakenberg, T., Forsen, S., Stenflo, J., 1996. Effect of Ca^{2+} on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. *Haemost.* 26(1):45–53.
- Tabatabaei, N., Giguere, Y., Forest, J., C., Rodd, C., J., Kremer, R., and Weiler, H., A., 2014. Osteocalcin is higher across pregnancy in Caucasian women with gestational diabetes mellitus. *Can J Diabetes.* 38:303–313.
- Takayagi, Y., 1999. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab.* 17: 57-60.
- Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K., L., et al. 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 111:305–317.
- Teitelbaum, S., L., 2007. Osteoclasts: what do they do and how do they do it. *Am J Pathol.* 170(2):427–435.
- Tome, M., Lopez-Romero, P., Albo, C., et al. 2011. MiR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 18 (6):985–995.
- Towler, D., A., and Rodan, G., A., 1995. Identification of a rat osteocalcin promoter 39, 59-cyclic adenosine monophosphate response region containing two PuGGTCA steroid hormone receptor binding motifs. *Endocrinol.* 136:1089-1096.
- Van de Loo, P., G., Soute, B., A., van Haarlem, L., J., and Vermeer, C., 1987. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem Biophys Res Commun.* 142:113–119.
- Van Leeuwen, J., P., T., M., Birkenhager, J., C., van der Bend, G., C., M., and Pols, H., A., P., 1996. *Biochim. Biophys. Acta.* 1312:55-62.

- Virvidakis, K., Georgion, E., Konkotsidis, A., Ntalles, K., and Proukasis, C., 1990. Bone mineral content of junior competitive weight-lifters. *Int. J. Sports Med.* 11:214-246.
- Visser, M. 2009. Towards a definition of sarcopenia results from epidemiologic studies. *J Nutr Health Aging.* 13 (8):713-716.
- Wai, P., Y., and Kuo, P., C., 2008. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 27:103-118.
- Wang, J., W., Tang, Q. Y., Ruan, H., J., and Cai, W., 2014. Relation between serum osteocalcin levels and body composition in obese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 58:729–732.
- Wei, J., Hanna, T., Suda, N., Karsenty, G., and Ducy, P., 2014. Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes.* 63:1021–1031.
- Willems, B., A., Vermeer, C., Reutelingsperger, C., P., and Schurgers, L., J., 2014. The realm of vitamin K dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification. *Mol Nutr Food Res.* 58:1620–1635.
- Wittich, A., Mautalen, C., A., Oliverly, M., B., Bagur, A., Somoza, F., and Rotemberg, E., 1992. Professional football players have a markedly greater skeletal mineral content, density and size than age- and BMI-matched controls. *Calcif. Tiss Int.* 63 (2):112-117.
- Xu, H., Xiao, W., Luo, D., Liu, Y., M., Zou, L., and Kuang, H., B., 2010. Association analysis of genetic polymorphisms and potential interaction of the osteocalcin (BGP) and ER-alpha genes with body mass index (BMI) in premenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin.* 31:455–460.
- Yang, R., and Gerstenfeld, L., C., 1996. Signal Transduction Pathways Mediating Parathyroid Hormone Stimulation of Bone Sialoprotein Gene Expression in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 271:29839-29846.
- Yang, S., Xu, H., Yu, S., Cao, H., Fan, J., Ge, C., et al. 2011. Foxo1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF1)/insulin regulation of osteocalcin expression by antagonizing Runx2 in osteoblasts. *J Biol Chem.* 286:19149–19158.
- Yeap, B., B., Chubb, S., A., Flicker, L., McCaul, K., A., Ebeling, P., R., Beilby, J., P., et al. 2010. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome

in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol.* 163:265–272.

- Yoon, K., G., Rutledge, S., J., Buenaha, R., F., and Rodan, G., A., 1988. Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Biochem.* 27:8521-8526.
- Yoshikawa, Y., Kode, A., Xu, L., Mosialou, I., Silva, B., C., Ferron, M., et al. 2011. Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *J Bone Miner Res.* 26:2012–2025.
- Yoshiko, Y., Candelieri, G., A., Maeda, N., and Aubin, J., E., 2007. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol.* 27 (12):4465–4474.
- Yoshizawa, T., Hinoi, E., Jung, D., Y., Kajimura, D., Ferron, M., Seo, J., et al. 2009. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *J Clin Invest.* 119:2807–2817.
- Yu, X., P., and Chandrasekhar, S., 1997. Parathyroid hormone (PTH 1–34) regulation of rat osteocalcin gene transcription. *Endocrinol.* 138:3085-3092.
- Zee, T., Settembre, C., Levine, R., L., and Karsenty, G., 2012. T-cell protein tyrosine phosphatase regulates bone resorption and whole-body insulin sensitivity through its expression in osteoblasts. *Mol Cell Biol.* 32:1080–1088.
- Zhang, R., Ducy, P., and Karsenty, G., 1997. 1,25 -Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Osteocalcin Expression in Mouse through an Indirect Mechanism. *J. Biol. Chem.* 272:110-116.
- Zhang, Y., Xie, R., L., Croce, C., M., et al. 2011. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (24): 9863–9868.
- Zhou, B., Li, H., Liu, J., Xu, L., Zang, W., Wu, S., et al. 2013. Intermittent injections of osteocalcin reverse autophagic dysfunction and endoplasmic reticulum stress resulting from diet-induced obesity in the vascular tissue via the NFkappaB-p65-dependent mechanism. *Cell Cycle.* 12:1901–1913.
- Zhou, B., Li, H., Xu, L., Zang, W., Wu, S., and Sun, H., 2013. Osteocalcin reverses endoplasmic reticulum stress and improves impaired insulin sensitivity secondary to diet-induced obesity through nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Endocrinol.* 154:1055–1068.

- Zoch, M., L., Clemens, T., L., and Riddle, R., C., 2015. New insights into the biology of osteocalcin, Bone. 82:42-49.
- Αγγελουπούλου – Σακαντάμη, Ν. (2004). Ειδική Αγωγή: αναπτυξιακές διαταραχές & χρόνιες μειονεξίες. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Μακεδονίας. Θεσσαλονίκη.
- Αμπατζίδης, Γ. (1997). Άσκηση και οστική μάζα στους νέους. Οστούν, 8(4):247-250.
- Αντωνιάδης, Κ. (2008). Εισαγωγή στην άσκηση με βάρη. Επιστημονικές Εκδόσεις Τελέθριον. Αθήνα.
- Ανωγειανιάκης, Γ. και Ευαγγέλου Α. (2008). Ιατρική Φυσιολογία. 11^η έκδοση. Σελ. 1075-1079.
- Κουστέλιος, Α. (2014). Άθληση για όλους: Οδηγός υλοποίησης προγραμμάτων. Εκδόσεις προοπτική. Τρίκαλα.
- Λαμπίρης, Η. Ε. (2003). Ορθοπαιδική και Τραυματιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα.
- Μέγας, Π. Δ. (2002). Όγκοι μυοσκελετικού συστήματος. Ορθοπαιδική κλινική Πανεπιστημίου Πατρών.
- Παπαγγελόπουλος, Π. Ι. (2001). Νεοπλασματα των οστών: Ορθοπαιδική-τραυματολογία. Δεπ α'ορθοπαιδικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Ρήγα, Ε. (2012). Οστεοπόρωση. Διπλωματική εργασία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Σουλίου και Ζορμπάνος, (2012). Άσκηση και ψυχική διάθεση Καθημερινή εφημεριδά του νομού Τρικάλων Η ενημέρωση 2006-2012.
- Φουσέκης, Κ. Α. (2015). Εφαρμοσμένη αθλητική φυσικοθεραπεία. Broken Hill Publishers LTD. Λευκωσία. Σελ. 39-65.
- Χατζηπαύλου, Α. Γ. και Κοντάκης, Γ. Μ. (2006). Ορθοπαιδική και Τραυματολογία Ι. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα.