



## Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines

Mohammad Reza Naghii<sup>1\*</sup>, Mahmood Mofid<sup>2</sup>, Ali Reza Asgari<sup>3</sup>, Mahdi Hedayati<sup>4</sup>, Maryam Sadat Daneshpour<sup>4</sup>

1. Sport Physiology Research Center and Nutrition Group, Health School, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Sport Physiology Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 30 Apr 2011

Accepted: 5 Aug 2011

### Abstract

**Introduction:** Boron possesses widespread properties and is important for human and animal nutrition. Since Boron is rapidly bioavailable, the objective of the present study was to determine whether acute (hourly or daily), and weekly supplementation could have any significant biological effects on the synthesis of steroids as well as inflammatory biomarkers.

**Methods:** Eight male volunteers participated in experiments on three occasions (day 0, 1 and 7). On the first day (day 0), a blood sample was collected at 8.00 A. M, followed by ingestion of placebo. On the next day (supplementation- day 1), similar procedure was followed by ingestion of 10 mg of boron capsule. On both occasions samples of blood were collected every 2 h for the next 6 h. Subjects consumed a capsule of 10 mg boron every day and on day 7, blood collection was carried out again at 8.00 A.M. Independent sample t-tests were used to evaluate the differences.

**Results:** Plasma boron was significantly increased following hourly ( $P=0.002$ ) and weekly ( $P=0.000$ ) consumption of boron. After one week of supplementation, free testosterone levels were significantly increased ( $P\leq 0.02$ ) and estradiol concentrations were significantly decreased ( $P\leq 0.01$ ). Dihydrotestosterone (DHT), cortisol and Vitamin D showed slight non significant, increases. The ratios of free testosterone/testosterone (FT/T) ( $P\leq 0.001$ ), free testosterone/estradiol (FT/E2) ( $P\leq 0.004$ ) and testosterone/estradiol (T/E2) ( $P\leq 0.009$ ) were significantly increased. Also, all 3 inflammatory biomarkers were decreased after supplementation.

**Conclusion:** Although there are previous studies that report a decrease in proinflammatory cytokines induced by boron consumption, to our knowledge, this is the first human study reporting an increase in plasma free testosterone concentrations following consumption of a boron supplement. This indicates a possible protective role against diseases of pathological conditions for this microelement.

**Key words:** Boron, Supplementation, Steroids, Cytokines

\* Corresponding author e-mail: naghiimr@yahoo.com  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## مقایسه اثر مکمل سازی روزانه و هفتگی بورون (Boron) بر هورمون های استروئیدی پلازما و سیتوکین های التهابی

محمد رضا نقی<sup>۱</sup>، محمود مفید<sup>۲\*</sup>، علیرضا عسگری<sup>۳</sup>، مهدی هدایتی<sup>۴</sup>، مریم السادات دانشپور<sup>۴</sup>  
 ۱. مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی و گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران  
 ۲. دپارتمان آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران  
 ۳. مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران  
 ۴. انستیتو تحقیقاتی علوم آندوکراین، مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران  
 دریافت: ۱۰ اردیبهشت ۹۰ پذیرش: ۱۴ مرداد ۹۰

### چکیده

**مقدمه:** بورون در تغذیه انسان و حیوان دارای خواص گسترده ای می باشد. با توجه به زیست دسترسی سریع بورون، هدف تعیین تاثیر مکمل سازی روزانه یا حاد و هفتگی بر سنتز هورمون های استروئیدی و بیومارکرهای التهابی بود.

**روش ها:** هشت مرد داوطلب در روز پایه (روز ۰)، در ساعت هشت صبح یک نمونه خون داده و یک کپسول پلاسیبو دریافت کردند. در روز بعد (روز ۱) در ساعت هشت صبح نمونه خون اخذ و یک کپسول حاوی ۱۰ mg بورون دریافت نمودند. نمونه ها در فواصل دو ساعته در مدت شش ساعت و هفت روز پس از مصرف کپسول بورون جمع آوری گردید. از آزمون تی زوج برای آنالیز آماری استفاده شد.

**یافته ها:** غلظت بورون چند ساعت پس از مکمل سازی روزانه و هفتگی به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. در اثر مکمل سازی هفتگی میانگین غلظت تستوسترون آزاد پلازما (FT) ( $P \leq 0.02$ ) افزایش و میانگین غلظت استرادیول (E2) ( $P \leq 0.01$ ) کاهش یافت، در حالیکه دی هیدروتستوسترون (DHT)، کورتیزول و ویتامین D یک افزایش غیر معنی دار در هفته را نشان دادند. نسبت تستوسترون آزاد / تستوسترون ( $FT/T (P \leq 0.001)$ ، تستوسترون آزاد / استرادیول ( $FT/E2 (P \leq 0.004)$  و تستوسترون / استرادیول ( $T/E2 (P \leq 0.009)$ ) افزایش یافت. همچنین، هر ۳ بیومارکر التهابی پس از مکمل سازی کاهش یافتند.

**نتیجه گیری:** این اولین مطالعه انسانی است که افزایش غلظت FT پلازما به دنبال مصرف مکمل بورون به تنهایی را گزارش می کند. با انجام مطالعات بیشتر میتوان احتمال تغییر هورمون های استروئیدی ناشی از مکمل سازی بورون و کاهش سیتوکین های التهابی و نهایتاً کاربرد آن به عنوان یک ریزمغذی نیروزا، یا تاثیر احتمالی یا نقش های محافظتی در ارتباط با بعضی از بیماری ها و وضعیت های پاتولوژیکی را به اثبات رساند.

**واژه های کلیدی:** بورون، مکمل سازی، هورمون های استروئیدی، سیتوکین ها

### مقدمه

دارای خواص واسطه بین فلزات و غیرفلزات می باشد. بورون از ویژگی های یک ماده مغذی ضروری برای انسان برخوردار است، بدین صورت که محرومیت رژیم می آن باعث تغییر در فاکتورهای بیولوژیکی شده که مخرب بوده و در صورت افزایش دریافت بورون اصلاح می شوند [۳۴]. نقش فلزات کمیاب رژیمی در سرطان ریه یک موضوع پژوهشی است که

بورون به عنوان یک عنصر کمیاب یک غیرفلزی است که

naghiimr@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

پاتولوژیک نظیر آرتريت و اوستئوپورز شناسایی گردد. نتایج یک مطالعه توسط Wallace et al. (2002) نشان داد که مکمل حاد 11.6 mg بورون که همراه با غذا داده شد به افزایش معنی‌دار غلظت بورون پلاسما در مقایسه با پلاسیبو در مردان میان سال سالم گردید. نتایج نشان داد که بورون به خوبی زیست دسترس بوده و از جذب بالایی برخوردار بود. در مجموع، یک افزایش ده برابر در بورون پلاسما در مقایسه با وضعیت ناشتا بدست آمد. بورون پلاسما به صورت معنی‌داری یک ساعت پس از مصرف مکمل با افزایش روبرو شد و پس از ۴ ساعت به اوج غلظت رسید. پس از ۶ ساعت مصرف، غلظت بورون پلاسما به صورت معنی‌داری بیشتر از غلظت پایه بود ( $0.124 \pm 0.02$  vs.  $0.01 \pm 0.008$  mg/l;  $p \leq 0.001$ ) [۴۶]. با توجه به دارا بودن یک چنین زیست دسترسی سریع، هدف مطالعه حاضر تعیین تاثیر مکمل‌سازی حاد یا روزانه بورون بر سنتز هورمون‌های استروئیدی و مطالعه امکان تاثیر مکمل‌سازی طولانی‌تر (هفتگی) بورون بر چنین فاکتورهای بود. با توجه به اینکه گزارش شده است که مکمل‌سازی بورون قادر به تسکین علائم آرتريت و التهاب در انسان است، لذا تاثیر آن بر بعضی از بیومارکرهای التهابی در پلاسما نیز تعیین شد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تایید گردید و فرم رضایت نامه در ابتدا از افراد داوطلب در بدو ورود به مطالعه کسب گردید.

هشت مرد داوطلب سالم با میانگین سنی  $41.3 \pm 7.5$  (دامنه ۲۹-۵۰) سال، از میان کارکنان و دانشجویان دانشگاه در این مطالعه شرکت کردند. همگی آنان از افراد غیر سیگاری و دارای شاخص توده بدنی  $25.5 \pm 2.2$  Kg/m<sup>2</sup> بودند. هیچ یک از آنان از رژیم خاصی پیروی نمی‌کرد و هیچ گونه دارو یا مکمل رژیمی مصرف نمی‌کرد و فاقد هر گونه پیشینه قلبی و بیماری آندوکراین بودند.

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی کنترل شده، مکمل‌سازی قبل و بعد بود. افراد در سه نوبت (روز پایه یا ۰، ۱ و ۷) به دنبال ۱۲ ساعت ناشتا به آزمایشگاه مراجعه کردند: در روز اول (روز ۰)، در ساعت هشت صبح یک نمونه خون

ارزش کار داشته و یافته‌ها نشان می‌دهند که بورون موجود در منابع غذایی در رژیم رایج آمریکایی همراه یا بدون استفاده از هورمون درمانی دارای نقش حفاظتی بر علیه سرطان ریه در زنان است. مکانیزم‌هایی که توسط آن بورون ممکن است بر سرطان ریه تاثیر بگذارد مبهم است، اما شواهد نشان می‌دهد که بورون ظاهراً دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی می‌باشد. همچنین گزارش‌ها نشان می‌دهند که سطوح استرادیول پلاسما پس از مصرف مکمل رژیمی بورون در انسان افزایش می‌یابد [۲۳] بنابراین یک امکان جالب این است که بورون رژیمی ظاهراً عمل درمان جایگزینی با هورمون را تقلید می‌کند تا بدین وسیله کاهش استروژن اندوژن پس از یائسگی را جبران کند. بر اساس اهمیت پتانسیل بورون رژیمی در دفاع میزبانی بر علیه شروع سرطان ناشی از التهاب و با توجه به یافته‌های قبلی که درمان جایگزینی با هورمون خطر سرطان ریه را کاهش می‌دهد، و زنانی که به طور مشترک دریافت بالای بورون داشته و از هورمون درمانی استفاده می‌کنند در معرض خطر کمتر سرطان ریه در مقایسه با زنانی که دریافت کم بورون دارند و هورمون درمانی انجام نمی‌دهند هستند. انجام پژوهش‌های بیشتری در ارتباط با نقش بورون رژیم و کارسینوژن‌ریز ریه مورد نیاز است [۲۲].

گزارش شده است که بورون برای تشکیل هورمون‌های استروئیدی ویژه مورد نیاز است و فرض بر این است که بورون با هورمون‌های استروئیدی از طریق تسهیل واکنش‌های هیدروکسیلاسیون برهم‌کنش داده و به طریقی هورمون‌های استروئیدی را از تجزیه سریع محافظت می‌کند. نتایج یک کارآزمایی کلینیکی ثابت کرد که سطوح استرادیول و تستوسترون در زنان یائسه به طور معنی‌داری پس از مصرف 3 mg/day بورون برای هفت هفته افزایش پیدا کرد. در این مطالعه مکمل‌سازی بورون باعث افزایش دو برابری در غلظت تستوسترون و افزایش معنی‌دار در احتباس کلسیم گردید [۳۴]. مطالعه دیگری در مردان افزایش معنی‌دار سطوح این دو هورمون را تایید کرد [۲۷]. در مجموع فاکتورهای بیوشیمیایی بورون هنوز بر اساس فرض استوار است. پژوهش‌های بعدی بایستی روی تعیین و تبیین این فاکتورهای تمرکز نموده تا مواردی نظیر شناسایی شاخص‌های وضعیت بورون و مشخص نمودن اهمیت تغذیه‌ای بورون در بعضی از وضعیت‌های

فاکتور نکروز دهنده تومور- آلفا (TNF- $\alpha$ ) مورد آنالیز قرار گرفتند.

فرا سنج های T، FT، DHT، E2، SHBG، cortisol، LH و hsCRP با روش ELISA، و با کیت های Diagnostics Biochem Canada Inc., Ontario, Canada آنالیز گردیدند. درصد ضریب تغییر (CVs) و حساسیت آزمایش به ترتیب برای T 5.1 و 0.022 mg/ml، برای FT 2 و 0.17 pg/ml، برای DHT 2.1 و 6 pg/ml، برای E2 6.1 و 10 pg/ml، برای SHBG 4.8 و 0.1 nmol/L، برای کورتیزول 3.1 و 0.4 ug/dl، برای LH 5.4 و 0.2 U/L، و برای hsCRP 1.4 و 10 ng/ml بود.

۲۵ هیدروکسی ویتامین D به روش EIA، Immuno Diagnostic Systems Ltd., Boldon, Tyne Wear, UK و با ضریب تغییر (CVs) و حساسیت آزمایش ۶/۹ و ۵ nmol/L، و اینترلوکین ۶ و TNF- $\alpha$  با روش ELISA، Diacclone, Besancon, France و حساسیت آزمایش ۴/۲ و ۲ pg/ml برای اینترلوکین ۶ و ۳/۳ و ۸ pg/ml برای TNF- $\alpha$  به ترتیب آنالیز گردیدند.

آنالیز آماری: داده ها بصورت mean $\pm$ SD ارائه شد و از بسته آماری (SPSS 17.0) برای انجام آنالیزهای آماری استفاده شد. از آزمون تی زوج برای آنالیز آماری و تعیین معنی دار بودن میانگین فراسنج های مورد مطالعه نظیر غلظت بورون و معنی دار بودن میانگین ساعتی (معدل سه اندازه گیری) روز پایه در مقابل روز ۱، میانگین فواصل سه زمانه در روز پایه در مقابل روز ۱ (نقاط زمانی مکمل سازی شده)، و میانگین نمونه های اخذ شده در ساعت هشت صبح در روز پایه در مقایسه با روز ۷ در مقاطع درمانی قبل و بعد برای بررسی تغییرات هورمون ها و بیومارکرهای التهابی استفاده شد.

## یافته ها

- تمام افراد شرکت کننده در این مطالعه با مصرف کامل مکمل های بورون شرکت کردند و فاقد هر گونه اثر سوء ناشی از مصرف بورون بودند. غلظت بورون پلاسمای افراد در مراحل پایه و مکمل سازی به شرح زیر ارائه شده است:
- غلظت بورون پلاسمای (ppm) در مرحله پایه یا زمان

از آنها اخذ گردید و پس از صرف صبحانه یک کپسول حاوی پودر لاکتوز به عنوان پلاسیبو دریافت کردند.

در روز بعد (روز ۱) در ساعت هشت صبح یک نمونه خون اخذ گردید و پس از صرف صبحانه یک کپسول حاوی ۱۰ mg بورون دریافت نمودند. مکمل بورون با استفاده از تترابورات سدیم و لاکتوز (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) تهیه شد. نمونه های خون در فواصل دو ساعته در مدت شش ساعت بعد اخذ گردید. هر نمونه پس از سانتریفیوژ و جداسازی سرم ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در ادامه، از داوطلبان درخواست شد تا روزانه به مدت هفت روز یک کپسول حاوی ۱۰ mg بورون همراه با صبحانه خود مصرف کنند و مجدداً با مراجعه در روز هفتم یک نمونه خون دیگر در ساعت هشت صبح جمع آوری گردید. مجدداً هر نمونه پس از سانتریفیوژ و جداسازی سرم ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پیروی از مصرف مکمل ها از طریق شمارش کپسول های اضافی ارائه شده مازاد بر مصرف یک هفته مورد پایش قرار گرفت.

نمونه های روز پایه، یک و هفت از نظر اندازه گیری بورون مورد آنالیز قرار گرفتند. برای انجام این کار از روش

Inductively coupled plasma – optical

emission spectrometry (ICP-OES)،

Perkin Elmer- Optima 2100 DV, USA;

با شرایط کاری جریان گاز پلاسمای (L/min): پلاسمای ۱۵، آگزیرلی ۰/۲، نبولایزر ۰/۵؛ قدرت Rf با مشعل ۱۳۰۰ وات و میزان جریان پمپ ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. نمونه ها با یک میلی لیتر اسید نیتریک ۲۰۰ mM بدون نیاز به حرارت مطابق با روش (Usuda et al. (1997) رقیق و تجزیه گردیدند. محدوده شناسایی آزمایش برای بورون در نمونه های پلاسمای معادل ۰/۰۱ ug/g بود [۴۴].

نمونه های پلاسمای خون زمان پایه (روز ۰) و نمونه های ساعتی (فواصل دو ساعته-روز ۱) و نمونه های پلاسمای خون هفتگی از نظر تستوسترون (T)، تستوسترون آزاد (FT)، دی هیدروتستوسترون (DHT)، استرادیول (E2)، گلبولین اتصال شونده به هورمون جنسی (SHBG)، کورتیزول، ۲۵- هیدروکسی ویتامین د، پروتئین واکنش دهنده با حساسیت بالا (hsCRP)، هورمون لوتینیازین (LH)، اینترلوکین ۶ (IL-6)،

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار هورمونها و بیومارکهای التهابی در زمان پایه (پلاسیبو) و ۶ ساعت مکمل سازی (روز ۱) با بورون

Variable	Mean±SD (day 0)	Mean±SD (day 1)	P Value •
Total Testosterone (ng/ml)	2.52±0.62	2.60±0.52	0.30
Free Testosterone (pg/ml)	9.42±4.59	9.58±4.32	0.70
Dihydrotestosterone (pg/ml)	645±137	658±142	0.40
Estradiol (pg/ml)	36.90±13.50	35.80±13.30	0.70
Sex Hormone Binding Globulin (nmol/L)	32.20±9.40	29.70±8.00	0.000
Cortisol (ug/dl)	4.63±2.29	4.07±1.73	0.06
Luteinizing Hormone (IU/L)	2.29±1.42	2.16±1.21	0.70
Vitamin D ♦ (nmol/L)	36.20±15.90	35.70±12.60	0.9
hsCRP (ng/ml) (n=7)	1372±1182	909±783	0.005
IL-6 ♦ (pg/ml)	1.32±0.65	1.17±0.65	0.6
TNF-α ♦ (pg/ml)	10.50±4.14	8.58±3.86	0.04

— اعداد میانگین حاصل سه اندازه گیری از هر شخص (n=8) است که از نمونه های خون اخذ شده در ساعت ۱۰،۰ صبح، ۱۲،۰ نیمروز و ۱۴،۰ بعد از ظهر است (۲۴ نمونه). — نمونه های ساعت ۸،۰ صبح با توجه به وضعیت پلاسیبو و عدم دریافت مکمل یا بورون در محاسبه وارد نشدند. ♦ نتایج آنالیز Vit. D, IL-6, and TNF-α از نمونه اخذ شده در ساعت ۱۴،۰ بعد از ظهر بدست آمده است. • P≤0.05 از نظر آماری معنی دار است.

میزان را نشان داد. میانگین و انحراف معیار هورمون ها و بیومارکهای التهابی در زمان پایه (پلاسیبو) با مرحله مکمل سازی بورون در فواصل دو ساعته (مقایسه روز ۰ با روز یک) در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است مقایسه این دو مقطع اختلاف معنی داری را نشان نداد و فقط غلظت های کمتر معنی دار SHBG و TNF-α مشاهده شد.

بررسی میانگین و انحراف معیار بورون های پلاسما و بیومارکهای التهابی در زمان پایه (پلاسیبو) و مکمل سازی هفتگی، به همراه نسبت هورمون ها (فقط در نمونه های ساعت ۸) در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که میانگین غلظت FT پلاسما به طور معنی داری افزایش یافت و میانگین غلظت E2 به طور معنی داری پس از یک هفته مکمل سازی کاهش یافت، در حالیکه DHT، کورتیزول و ویتامین D یک افزایش بدون معنی دار در زمان یک هفته پس از مکمل سازی را نشان دادند. نسبت FT/T، FT/E2 و T/E2 بطور معنی داری افزایش پیدا کرد.

مصرف پلاسیبو برابر با  $0.036 \pm 0.021$  ppm؛ ۶ ساعت پس از مکمل سازی (روزانه) با ۱۰ میلی گرم بورون برابر با  $0.066 \pm 0.028$  ppm؛ و پس از مکمل سازی هفتگی برابر با  $1.32 \pm 0.057$  ppm گزارش گردید. وسعت افزایش بورون برای زمان پایه در مقایسه با زمان روزانه و هفتگی به ترتیب  $1/83$  و  $36$  برابر افزایش را نشان داد که این میزان در مقایسه زمان روزانه با هفتگی بیست برابر بود.

میانگین و انحراف معیار هورمون های پلاسما و بیومارکهای التهابی در زمان پایه (روز ۰) و چند ساعت پس از مکمل سازی روز ۱ در جدول ۱ نشان داده شده است. برای ویتامین D و بیومارکهای التهابی فقط نتایج نمونه های اخذ شده در ساعت ۱۴ بعد از ظهر ارائه شده است. نتایج نشان داد که مکمل سازی بورون در ظرف چند ساعت اثر معنی دار بر غلظت هورمون ها نداشته، فقط غلظت SHBG با کاهش معنی دار رو به رو شد. از میان بیومارکهای التهابی، hsCRP پلاسما به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین، سطوح TNF-α یک کاهش معنی دار در میانگین به دست آمده دو روز مختلف در

جدول ۲- مقایسه مقاطع دو ساعته میانگین و انحراف معیار هورمون‌ها و بیومارکهای التهابی درروز پایه (پلاسیبو) و روز ۱ (مکمل سازی با بورون)

Variable	Placebo (hours)				Boron Supplementation (hours)			
	8.00 A.M	10.00 A.M	12.00 P.M	14.00 P.M	8.00 A.M*	10.00 A.M	12.00 P.M	14.00 P.M
TT (ng/ml)	3.20±0.60	2.59±0.61	2.48±0.68	2.48±0.64	—	2.63±0.44	2.48±0.52	2.69±0.62
FT (pg/ml)	11.83±4.60	9.45±5.10	9.01±4.80	9.81±4.30	—	8.55±4.30	8.92±4.20	11.25±4.30
DHT (pg/ml)	741±152	652±145	641±155	643±129	—	636±131	631±119	707±176
Estradiol (pg/ml)	42.33±16.47	40.30±16.00	33.50±13.00	36.80±12.30	—	41.60±12.90	32.0±11.20	33.80±15.30
SHBG(nmol/L)	32.99±9.97	31.90±10.10	32.50±9.80	32.30±9.40	—	30.08±9.50*	29.50±7.60*	29.40±7.60 *
Cortisol (ug/dl)	7.93±4.62	5.70±2.80	4.18±1.69	4.01±2.12	—	4.55±1.71	3.70±1.52	3.96±2.05
LH (IU/L)	1.74±0.70	2.18±1.39	2.47±1.62	2.22±1.40	—	2.16±1.35	2.13±1.38	2.20±1.35
Vitamin D (nmol/L)	35.82±13.49	—	—	36.27±15.30	—	—	—	35.70±12.60
hsCRP (ng/ml) (n=7)	1460±1233	1545±1342	1287±1192	1284±1175	—	942±874	894±831	892±767
IL-6 (pg/ml)	1.55±1.05	—	—	1.32±0.65	—	—	—	1.17±0.65
TNF-α (pg/ml)	12.32±3.13	—	—	10.50±4.10	—	—	—	8.50±3.80 *

• 8.0 A.M نمونه زمان پایه یا مکمل سازی نشده در روز اول است. \* از نظر آماری معنی دار (P≤0.05) در مقایسه با زمان مشابه در وضعیت پلاسیبو (روز ۰)؛ پلاسیبو در مقایسه با نمونه مکمل سازی شده.

**جدول ۳-** میانگین و انحراف معیار هورمونها و بیومارکهای التهابی و نسبت هورمونها در زمان پایه (پلاسیبو) و یک هفته مکمل سازی (روز ۷) با بورون، مقایسه روی نمونه های اخذ شده در ساعت ۸،۰۰ صبح {

Variable	Mean±SD (day 0)	Mean±SD (day 7)	P Value •
Total Testosterone (ng/ml)	3.20±0.60	3.32±0.56	0.73
Free Testosterone (pg/ml)	11.83±4.60	15.18±3.07	0.02
Dihydrotestosterone (pg/ml)	741±152	791±120	0.34
Estradiol (pg/ml)	42.33±16.47	25.81±11.25	0.01
Sex Hormone Binding Globulin (nmol/L)	32.99±9.97	31.44±9.06	0.27
Cortisol (ug/dl)	7.93±4.62	10.10±4.88	0.25
Luteinizing Hormone (IU/L)	1.74±0.70	2.06±1.01	0.40
Vitamin D (nmol/L)	35.82±13.49	38.36±12.09	0.32
hsCRP (ng/ml) (n=7)	1460±1233	795±734	0.11
IL-6 (pg/ml)	1.55±1.05	0.87±0.15	0.09
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	12.32±3.13	9.97±3.23	0.05
FT/T (pg/ml/ng/ml)	3.62±1.02	4.66±1.08	0.001
FT/E2 (ng/ml)	0.31±0.15	0.67±0.29	0.004
T/E2 (ng/ml)	91.68±54.8	148.8±58.7	0.009
T/SHBG (ng/dl)	31.13±14.7	33.21±13.4	0.48
DHT/T (ng/ml)	0.23±0.01	0.24±0.02	0.29

• P≤0.05 از نظر آماری معنی دار است.

جذب آن و سنتز هورمون های استروئیدی یا کاهش تخریب آن ها مورد مطالعه قرار گرفت. در این کارآزمایی مکمل سازی یک دوز ۱۰ mg/d انتخاب شد، زیرا این مقدار با رژیم غذایی قابل طراحی بوده و مقداری سالم و بی خطر می باشد [۹،۳۳] و پس از یک هفته به افزایش معنی دار غلظت تستوسترون آزاد در پلاسما منتهی شد.

شایان ذکر است که این اولین مطالعه انسانی است که افزایش غلظت FT پلاسما به دنبال مصرف مکمل بورون به تنهایی را گزارش می کند. قبلاً، مکمل سازی مردان سالم با ۱۰ mg در روز باعث افزایش غلظت استرادیول پلاسما گردیده بود [۲۷] و این افزایش با گزارشات دیگر در مورد حیوانات همخوانی داشت [۴۰،۴۱]، و نشان داده شد که تغییرات در تستوسترون پلاسما بوسیله بورون در موش رت قابل کسب بوده [۲۸] و همچنین موش هایی که در رژیم خود بورون را به مدت ۳۰ تا ۶۰ روز مصرف نمودند نیز ویژگی وابستگی به دوز

همچنین، هر ۳ بیومارکر التهابی پس از مکمل سازی کاهش یافتند، که اختلاف معنی دار برای سطوح TNF- $\alpha$  و یک کاهش چشمگیر غیرمعنی دار (حدود ۵۰٪) برای سطوح hsCRP و IL-6 مشاهده شد. دلیل برای عدم معنی دار بودن این متغیرها کسب انحراف معیار گسترده و وسیع بوده است.

## بحث

در مطالعه حاضر مشاهده شد که بورون به خوبی زیست دسترس بوده و از جذب بالایی برخوردار است. به طور کلی یک افزایش چند برابر در بورون پلاسما در مقایسه با شرایط ناشتا دیده شد. یافته های مکمل سازی ساعتی با نتایج مطالعه گزارش شده توسط Wallace et al. (2002) [۴۶]، از اینرو در ادامه، اثر مکمل سازی حاد یا روزانه بورون در ارتباط با

سرم در مردان سالم به دنبال مصرف مکمل بورون پس از چهار هفته گزارش گردید [۲۷]. بر این اساس، به نظر می‌رسد که بورون می‌تواند تعادل عناصر استخوانی را از طریق افزایش سنتز و یا عمل هورمون‌های جنسی تغییر دهد.

در دنیای معاصر ورزشی مواد نیروزا و استروئیدهای سنتزی مصرف و کاربرد وسیعی داشته که در بین ورزشکاران غیر حرفه‌ای مساله‌ای شایع است. کاربرد غیر مجاز مکمل‌های تستوسترون می‌تواند ریسک هیپریپلازی پروستات و احتمالاً سرطان آن، نارسایی‌های انعقادی منجر شونده به جراحات عروق مغزی، دیس لیپیدی و ناباروری را افزایش دهند [۳۷]. از این رو، افزایش هورمون‌های استروئیدی آندوژن در نتیجه مکمل‌سازی بورون حاوی این پیام است که بورون ممکن است به عنوان یک ماده سالم و بی‌خطر نیروزا در ورزشکاران مصرف شود که نیاز به بررسی و تایید بیشتر دارد [۲۶]. بررسی‌های وسیع بالینی و اپیدمیولوژیکی نشان دادند که مساله سلامت به طور کل در میان مردان آمریکایی با سطوح بالاتر تستوسترون و بروز کمتر هیپوگنادسیم بالینی در مردان مسن‌تر همبستگی دارد [۱۸، ۱۵]. سطوح کمتر تستوسترون تام و آزاد با سندروم متابولیک و دیابت نوع ۲ که هردو وضعیت مرتبط با بیماری قلبی - عروقی هستند ارتباط دارند و نشان داده شده است که باعث مرگ و میر بیشتر قلبی - عروقی در مردان در سنین میان‌سالی و بالاتر می‌شود [۱۱، ۱۶، ۳۹]. بیان شده است که تستوسترون آزاد رابطه معکوس با پیشرفت ضخامت carotid intima-media داشته [۱۰]، و کاهش تستوسترون آزاد با  $ankle-brachial\ index < 0.90$  همبستگی دارد [۴۲]. اثر هورمون‌های گونادی بر متابولیسم استخوان و بروز ریسک شکستگی در مردان در حال بررسی است [۱۴، ۳۶]، و ریسک شکستگی در میان مردان دارای تستوسترون پایین [۲۴] یا تستوسترون آزاد [۴۳]، یا به ندرت در حضور چگالی کم غیرطبیعی مواد معدنی استخوان [۴۵]، بیشتر می‌باشد. به نظر می‌رسد بورون با افزایش میزان استروئید آندوژن یک نقشی را در تغذیه انسانی بویژه در رابطه با سلامت استخوان ایفا می‌کند. مکمل‌سازی هفتگی باعث کاهش معنی‌دار در غلظت  $TNF-\alpha$  پلاسما و یک کاهش نمایان (حدود ۵۰٪) در غلظت hsCRP و اینترلوکین ۶ گردید. این اولین گزارش یک مطالعه انسانی است که اثر مکمل‌سازی بورون بر کاهش سطح

و زمان این عنصر را نشان دادند [۲۱]. با این وجود، کاهش معنی‌دار در غلظت استرادیول پلاسما پس از یک هفته بیانگر نسبت بیشتر تبدیل TT به FT در مسیر متابولیک تستوسترون است. در تایید این یافته‌ها، نسبت‌های  $FT/T$ ،  $T/E2$ ، و  $FT/E2$  همگی به طور معنی‌داری افزایش یافته که بیانگر وضعیت افزایش آندروژن می‌باشد. این نکته به خوبی شناخته شده است که آندروژن اصلی مردان تستوسترون بوده و حدود ۹۸٪ مولکول تستوسترون به پروتئین‌هایی در خون، بویژه SHBG، آلبومین و گلوبولین اتصال شونده به کورتیزول اتصال دارند. فرض گرفته شده است که هورمون‌های اتصال شده از مویرگ‌های خونی خارج نمی‌شوند و قابل دسترس نیستند [۶]. از اینرو، افزایش تستوسترون آزاد غیر اتصالی توسط بورون از این فرضیه حمایت می‌کند که بورون دارای یک نقش بیولوژیکی در تولید هورمون‌های استروئیدی می‌باشد. فرضیه هورمون آزاد بیان می‌کند که فعالیت بیولوژیک یک هورمون مورد نظر بواسطه بخش آزاد آن در پلاسما تعریف می‌شود. این فرضیه به نظر می‌رسد که برای تستوسترون آزاد که میزان آن تحت تاثیر بورون قرار گرفته است متصور باشد. این تستوسترون آزاد شکل فعال بیولوژیک این هورمون است که می‌تواند با گیرنده‌های بافت هدف برهم‌کنش بدهد. با توجه به اثر مشاهده بورون بر غلظت هورمون‌های استروئیدی و نقش‌های متعدد آن‌ها در متابولیسم تعجیبی نیست که بورون در مبحث بعضی از بیماری‌ها دارای کاربرد است. به نظر می‌رسد که این عنصر دارای یک نقش در بعضی از نارسایی‌ها با اتیولوژی ناشناخته نظیر استئوپوروز در زنان یائسه که دچار اختلال در متابولیسم عناصر اصلی هستند باشد [۳۴].

بورون برای متابولیسم کلسیم و استخوان یک عنصر بهینه بوده [۳۰، ۳۱]. و به طور ویژه این عمل را از طریق افزایش هورمون در زنان یائسه [۳۴]. و سنتز یا افزایش تنظیم ویتامین D اعمال می‌کند [۲۵، ۲۹].

مکانیزمی که توسط آن بورون بر تعادل عناصر در استخوان تاثیر می‌گذارد هنوز ناشناخته است [۳۸]. با این وجود، مطالعات انجام شده توسط Nielsen et al. (1987) نشان می‌دهد که تامین بورون در رژیم زنان یائسه که قبلاً دارای رژیم حاوی بورون کم بودند باعث افزایش هورمون استرادیول و تستوسترون گردید [۳۴]. افزایش مشابهی در سطوح استرادیول



با بورون در این مطالعه با کاهش روبرو شدند. استفاده از مواد مغذی می‌تواند یک بخش حیاتی از یک برنامه جامع برای کاهش اثرات نامطلوب بر سیستم تولید هورمون‌های جنسی، تنظیم و متابولیسم آن‌ها باشد. در میان مواد مغذی گوناگون نقش بورون بر وضعیت هورمون‌های جنسی به خوبی شناخته نشده است؛ با این وجود، در مطالعات محدودی افزایش سطح استروئیدهای جنسی پس از مکمل‌سازی با بورون در هر دو جنس گزارش شده است. به نظر می‌رسد نحوه عمل وابسته به دوز و زمان باشد که در گزارش‌های قبلی از طریق افزایش تستوسترون و استرادیول؛ و در این کارآزمایی از طریق افزایش تستوسترون آزاد و کاهش سطوح استرادیول با مکمل‌سازی کوتاه مدت تایید شده است. نتایج حاضر همگام با نتایج محدود قبلی نشان می‌دهد که سنتز استروئیدهای با منشا داخلی یا کاهش تجزیه آن‌ها تحت تأثیر یکی از عوامل رژیم‌ی مینور موجود در خشکبار، بقولات، میوه‌های خشک/تازه، و سبزی‌ها قرار دارد. انجام مطالعات بیشتر لازم و ضروری است تا احتمال تغییر هورمون‌های استروئیدی ناشی از مکمل‌سازی بورون و کاهش سیتوکین‌های التهابی و نهایتاً کاربرد آن به عنوان یک ریزمغذی نیروز، تأثیر احتمالی یا نقش‌های محافظتی در ارتباط با بعضی از بیماری‌ها یا وضعیت‌های پاتولوژیکی را به اثبات برساند. از این رو، پیشنهاد می‌شود کارآزمایی دیگری در ظرف مدت ۶ تا ۸ هفته و با انجام نمونه‌گیری هفتگی انجام گیرد.

### سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند قدردانی می‌گردد.

بیومارکرهای التهابی را بیان می‌کند. علت معنی‌دار نشدن hsCRP و IL-6 علی‌رغم کاهش ۵۰٪ بواسطه مقادیر گسترده انحراف معیار بدست آمده برای این دو متغیر می‌باشد. یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که بورون و بورات دارای خواص آنتی‌کارسینوژنیک هستند [۱۳، ۱۲]، و اسید بوریک پرولیفراسیون سلول‌های سرطانی پروستات انسانی را مهار می‌کند [۵، ۱۳] و بروز یافته‌های هیستوپاتولوژیک مرتبط با سرطان سرویکس را کاهش می‌دهد [۲۰]. دریافت بورون رابطه معکوس با سرطان ریه در زنان داشته و زنانی که مصرف کم بورون داشته و از (HRT) استفاده نمی‌کردند در معرض خطر بیشتری قرار داشتند [۲۲]. همچنین شواهد حاکی از این است که بورون دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد [۴، ۳۲]. پیشنهاد می‌شود که در طی مطالعه‌ای آثار فوق‌الذکر به طور همزمان با تغییرات در غلظت‌های هورمون‌های استروئیدی به صورت نتیجه وضعیت کمبود بورون یا مکمل‌سازی بورون مورد مطالعه قرار گیرد.

افزایش سطح CRP خون به طور مستقل با شیوع بیماری قلبی-عروقی ارتباط داشته و قویاً پیش‌بینی کننده حوادث قلبی-عروقی در آینده نظیر حمله قلبی و سکته مغزی می‌باشد [۱، ۲، ۱۹، ۳۵]. در افراد سالم، کاهش سطح پروتئین واکنش دهنده C، به عنوان یک بیومارکر کلیدی التهاب باعث ایجاد کاهش در حوادث قلبی شده است. بنابراین سطوح کاهش یافته hsCRP پس از مکمل‌سازی با بورون از نظر کلینیکی قابل دستیابی است. شرکت‌های دارویی به طور فعال در حال تولید داروهایی هستند که هدف آن‌ها کاهش سطوح CRP می‌باشد [۱۹]. بعلاوه TNF- $\alpha$  و IL-6 که هر دو به عنوان ریسک فاکتور بیماری عروق کرونر و عملکرد سیستم قلبی-عروقی و مورفولوژی آن دسته‌بندی شده‌اند باعث تجمع چربی اکتویپیک در بافت‌های گوناگون می‌شوند [۳، ۸، ۱۷]. که در اثر مکمل‌سازی

## References

- [1] Alber HF, Wanitschek MM, de Waha S, Ladurner A, Suessenbacher A, Dörler J, Dichtl W, Frick M, Ulmer H, Pachinger O, Weidinger F, High-density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and prevalence and severity of coronary artery disease in 5641 consecutive patients undergoing coronary angiography. *Eur J Clin Invest* 38 (2008) 372-80.
- [2] Anuurad E, Tracy RP, Pearson TA, Kim K, Berglund L, Synergistic role of inflammation and insulin resistance as coronary artery disease risk factors in African

- Americans and Caucasians. *Atherosclerosis* 205 (2009) 290-5.
- [3] Arkhipova SV, Zorin NA, Iankin MIu, Podkhomuthnikov VM, Zorina VN, Zorina RM, Kraiushkina NA, Cytokine and acute phase inflammation reactant levels in men with myocardial infarction. *Klin Med (Mosk)* 87 (2009) 20-3.
- [4] Armstrong T A and Spears J W, Effect of boron supplementation of pig diets on the production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J Anim Sci* 81 (2003) 2552-2561.
- [5] Barranco WT, Eckhert CD, Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 216 (2004) 21-29.
- [6] Bhasin S, Testicular disorders. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*, 11th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier, 2008, P. 645-699.
- [7] Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB, Eckhert CD, Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 11 (2004) 887-892.
- [8] Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JP, Lennon L, Eiriksdottir G, Rumley A, Whincup PH, Lowe GD, Gudnason V, Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med* 5 (2008) e78.
- [9] Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: *National Academy press*; 2004.
- [10] Fu L, Gao QP, Shen JX, Relationship between testosterone and indexes indicating endothelial function in male coronary heart disease patients. *Asian J Androl* 10 (2008) 214-8.
- [11] Fukai S, Akishita M, Miyao M, Ishida K, Toba K, Ouchi Y, Age-related changes in plasma androgen levels and their association with cardiovascular risk factors in male Japanese office workers. *Geriatr Gerontol Int* 10 (2010) 32-9.
- [12] Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol* 32 (2004) 73-8.
- [13] Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE, Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *Prostate* 54 (2003) 44-49.
- [14] Goderie-Plomp HW, van der Klift M, de Ronde W, Hofman A, de Jong FH, Pols HA, Endogenous sex hormones, sex hormone-binding globulin, and the risk of incident vertebral fractures in elderly men and women: the Rotterdam Study. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 3261-9.
- [15] Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C, Age, disease, and changing sex hormone levels in middle aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 73 (1991) 1016-25.
- [16] Grossmann M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, Sharpe K, Macisaac RJ, Clarke S, Zajac JD, Jerums G, Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (2008) 1834-40.
- [17] Gustafson B, Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17 (2010) 332-41.
- [18] Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001)v24-v31.
- [19] Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J, C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 375 (2010) 132-40.
- [20] Korkmaz M, Uzgoren E, Bakirdere S, Aydin F, Ataman OY, Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ Toxicol* 22 (2007) 17-25.
- [21] Lee IP, Sherins RJ, Dixon RL, Evidence for induction of germinal aplasia in male rats by environmental exposure to boron. *Toxicol Appl Pharmacol* 45 (1978) 577-90.
- [22] Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR, Dietary Boron and Hormone

- Replacement Therapy as Risk Factors for Lung Cancer in Women. *Am J Epidemiol* 167 (2008) 1070-80.
- [23] Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL, Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environ Health Perspect* 102 (1994) 79-82.
- [24] Meier C, Nguyen TV, Handelsman DJ, Schindler C, Kushnir MM, Rockwood AL, Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Arch Intern Med* 168 (2008) 47-54.
- [25] Miljkovic D, Miljkovic N, McCarty MF, Up-regulatory impact of boron on vitamin D function- does it reflect inhibition of 24-hydroxylase? *Med Hypotheses* 63 (2004) 1054-1056.
- [26] Naghii MR, The significance of dietary boron, with particular reference to athletes. *Nutr Health* 13 (1999) 31-37.
- [27] Naghii MR, Samman S, The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biol Trace Elem Res* 56 (1997) 273-286.
- [28] Naghii MR, Samman S, The effect of boron supplementation on the distribution of boron in selected tissues and on testosterone synthesis in rats. *J Nutr Biochem* 7 (1996) 507-512.
- [29] Naghii MR, Samman S, The effect of boron on plasma testosterone and plasma lipids in rats. *Nutr Res* 17 (1997) 523-532.
- [30] Naghii MR, Torkaman G, Mofid M, Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats. *Biofactors* 28 (2006) 195-201.
- [31] Nielsen FH, Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors* 20 (2004) 161-171.
- [32] Nielsen F H, The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* 16 (2000) 512-4.
- [33] Nielsen FH, Ultratrace minerals: boron. In: Shils ME, Oslen JA, Shike M, editors. *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994, p. 272-274.
- [34] Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR, Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J* 1(1987) 394-397.
- [35] Orri JC, Carter SR, Howington EB, Gender comparison of C-reactive protein and cardiovascular disease risk in college students and intercollegiate athlete. *J Sports Med Phys Fitness* 50 (2010) 72-8.
- [36] Prince RL, Dick IM, Beilby J, Dhaliwal SS, Devine A, A cohort study of the effect of endogenous estrogen on spine fracture risk and bone structure in elderly women and an assessment of its diagnostic usefulness. *Bone* 41 (2007) 33-8.
- [37] Rhoden EL, Morgentaler A, Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med* 350 (2004) 482-92.
- [38] Sheng MH, Taper LJ, Geit H, Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats. *Biol Trace Elem Res* 82 (2001) 109-123.
- [39] Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med* 166 (2006) 1660-5.
- [40] Sisk DB, Colvin BM, Bridges CR, Acute, fatal illness in cattle exposed to boron fertilizer. *J Am Vet Med Assoc* 193(1998) 943-945.
- [41] Sisk DB, Colvin BM, Merrill A, Bondari K, Bowen JM, Experimental acute inorganic boron toxicosis in the goat: effects on serum chemistry and CSF biogenic amines. *Vet Hum Toxicol* 32 (1990) 205-211.
- [42] Tivesten A, Mellström D, Jutberger H, Fagerberg B, Lernfelt B, Orwoll E, Karlsson MK, Ljunggren O, Ohlsson C, Low serum testosterone and high serum estradiol associate with lower extremity peripheral arterial disease in elderly men. The MrOS Study in Sweden. *J Am Coll Cardiol* 50 (2007) 1070-6.
- [43] Tuck SP, Scane AC, Fraser WD, Diver MJ, Eastell R, Francis RM, Sex steroids and bone turnover markers in men with symptomatic vertebral fractures. *Bone* 43 (2008) 999-1005.
- [44] Usuda K, Kono K, Yoshida Y, Serum boron concentration from inhabitants of an urban area in Japan. Reference value and interval for the health screening of boron exposure. *Biol Trace Elem Res* 56 (1997) 167-78.

[45] Vokes TJ, Gillen DL, Using clinical risk factors and bone mineral density to determine who among patients undergoing bone densitometry should have vertebral fracture assessment. *Osteoporos Int* 21 (2010) 2083-91.

[46] Wallace JMW, Hannon-Fletcher MPA, Robson PJ, Gilmore WS, Hubbard SA, and Strain JJ, Boron supplementation and activated factor VII in healthy men. *Europ J Clin Nutr* 56 (2002) 1102-1107.