UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa: Weterynaria

Lek. wet. Małgorzata Manastyrska - Stolarczyk

Rozprawa doktorska

Wpływ pyłku sosnowego na mineralizację i wytrzymałość mechaniczną układu kostnego samców szczurów w warunkach doświadczalne osteopenii wywołanej orchidektomią.

The influence of pine pollen on mineralization and mechanical strength of the skeletal system in male rats under experimantal conditions of orchidectomy-induced osteopenia.

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Radosław Piotr Radzki
Promotor pomocniczy**:** dr n. med. Paweł Polak

Lublin, 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem
i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data ..... Podpis promotora .....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych
z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data ..... Podpis autora .....

* niepotrzebne skreślić

Promotorowi mojej pracy

Szanownemu Panu prof. dr hab. Radosławowi Piotrowi Radzkiemu,

promotorowi pomocniczemu

Szanownemu Panu dr n. med. Pawłowi Polakowi

oraz Szanownemu Panu dr hab. Markowi Bieńko

składam serdeczne podziękowania

za poświęcony czas, opiekę, pomoc merytoryczną, zaangażowanie w trakcie realizacji niniejszej rozprawy oraz cierpliwość, życzliwość, wyrozumiałość, skuteczne motywowanie
do działania i przede wszystkim stworzenie sprzyjających warunków do szeroko pojętego rozwoju i realizacji zamierzonych celów naukowych.

Dziękuję pracownikom Katedry Fizjologii Zwierząt

za życzliwość i pomoc w realizacji badań

Dziękuję moim najbliższym

za wsparcie, cierpliwość i skuteczną mobilizację mnie do działania w chwilach zwątpienia

Spis treści

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA 2
1.1. Biologiczne znaczenie związków fitosterolowych 2
1.2. Fitoestrogeny. 3
1.3. Fitoandrogeny. 5
1.3.1. Fitoandrogeny a zaburzenia seksualne. 6
1.3.2. Fitoandrogeny a nowotwory. 8
1.3.3. Aktywność przeciwutleniająca fitoandrogenów. 8
1.3.4. Fitoandrogeny a otyłość i związany z nią zespół metaboliczny. 9
1.3.5. Fitoandrogeny a kości 10
1.4. Pyłek sosnowy. 11
1.5. Rola androgenów w metabolizmie tkanki kostnej samców. 14
1.6. Osteoporoza u mężczyzn. 19
2. CEL PRACY 24
3. MATERIAŁ I METODY 25
3.1. Część doświadczalna realizowana z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych 26
3.2. Densytometryczna analiza całego szkieletu i izolowanych kości piszczelowych 28
3.3. Analiza izolowanych kości piszczelowych z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT). 28
3.4. Analiza wytrzymałościowa izolowanych kości. 30
3.5. Mikrotomograficzna (μ-CT) analiza morfometryczna tkanki kostnej gąbczastej 31
3.6. Analiza tkanki mięśniowej z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT) 32
3.7. Analizy biochemicznych wskaźników metabolizmu tkanki kostnej 35
3.8. Analiza statystyczna 35
4. WYNIKI 36
4.1. Analiza densytometryczna (DXA) całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych 36
4.2. Tomograficzna analiza tkanki kostnej zbitej w połowie długości kości piszczelowych. 40
4.3. Analiza tkanki kostnej gąbczastej w bliższej części przynasadowej kości piszczelowej z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego. 42
4.4. Tomograficzna analiza tkanki mięśniowej. 44
4.5. Analiza właściwości strukturalnych tkanki kostnej gąbczastej bliższej części przynasadowej kości piszczelowych z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej (μ-CT) 46
4.6. Ocena wytrzymałości mechanicznej kości piszczelowych przeprowadzona z wykorzystaniem trójpunktowego testu ugięcia. 48
4.7. Ocena biochemicznych wskaźników metabolizmu kostnego. 51
***5.* DYSKUSJA 53**
6. WNIOSKI 70
7. SPIS SKRÓTÓW 71
8. PIŚMIENNICTWO 75
9. STRESZCZENIE 101
10. SUMMARY ..... Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

„To zdrowie jest prawdziwym bogactwem, a nie kawałki złota i srebra". Autorem tych słów jest Mahatma Gandhi (1869-1948).

Metody dbania o zdrowie i leczenia różnych chorób opracowywano od dawna. Niegdyś podstawą receptur leków były składniki naturalnego pochodzenia, zazwyczaj części roślin, narządy zwierząt lub minerały, a pierwszym znanym farmaceutą i zarazem twórcą jednej z najważniejszych tez kodeksu lekarskiego: „przede wszystkim nie szkodzić" był Imhotep [1, 2].

Wiedza o chorobach i ich leczeniu gromadzona była przez stulecia. Rozwój farmakologii opierał się na wykorzystaniu naturalnych produktów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a wiedzę tę przekazywano kolejnym pokoleniom [3]. Jednymi z najstarszych receptur leków pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i mineralnego są te znalezione w Babilonii i Asyrii z 2100 r. p.n.e. Część z nich, jak np. kora, żywica drzew, oleje roślinne, sól, saletra itd., jest wykorzystywana do dziś [4-10]. Współczesne osiągnięcia naukowe umożliwiają szybką reakcję na większość problemów zdrowotnych. Pozwalają na to nowoczesne metody diagnostyczne, jak i coraz skuteczniejsze leki [11, 12].

1.1. Biologiczne znaczenie związków fitosterolowych

Fitosterole to związki chemiczne o budowie sterydowej występujące naturalnie w roślinach, wykazujące aktywność biologiczną oraz prozdrowotny wpływ na organizm ludzki i zwierzęcy. Dodatkowo różne gatunki roślin cechuje odmienna kompozycja fitosteroli [13]. Dotychczas określono ok. 250 takich związków. Do najlepiej poznanych

należą polifenole (flawonoidy, katechiny, resweratrol i kwasy fenolowe), karotenoidy (beta-karoten, likopen i luteina), fitosterole (podobne strukturalnie do cholesterolu), izoflawony (obecne w roślinach strączkowych), a także terpenoidy, saponiny, alkaloidy, kwasy aromatyczne, kwasy organiczne, olejki eteryczne oraz inhibitory proteaz [14]. Mogą one być składnikami suplementów diety lub leków [15]. Dowiedziono ich właściwości przeciwzapalnych, przeciwpasożytniczych, przeciwnowotworowych, przeciwutleniających, antyproliferacyjnych, antymutagennych, a także przyspieszających gojenie się ran [13, 16]. Fitosterole stosuje się m.in. do leczenia schorzeń metabolicznych, neurologicznych i immunologicznych. Stanowią ochronę przed mikroorganizmami chorobotwórczymi, z powodzeniem stosuje się je również jako repelenty na owady. Wykorzystywane są w leczeniu otyłości, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, stłuszczenia wątroby, a także w profilaktyce chorób jamy ustnej, dziąseł i przyzębia [14, 17-20].

Na szczególną uwagę zasługują związki izolowane z roślin, cechujące się dużą homologią strukturalną z hormonami zwierzęcymi, wykazując przy tym tylko nieznaczne różnice w budowie chemicznej. Należą do nich m. in. związki strukturalnie zbliżone do estrogenów i androgenów [21-23].

1.2. Fitoestrogeny.

Fitoestrogeny są niesteroidowymi związkami, które swoją budową strukturalną `przypominają 17β-estradiol. Wśród tej grupy wyróżnia się następujące podgrupy: izoflawony, kumestany, lignany, stilbeny oraz flawonoidy. Najlepiej poznane są izoflawony [24, 25]. Ich bogatym źródłem jest m. in. soja i koniczyna czerwona [26]. Fitoestrogeny łączą się z receptorami estrogenowymi, a efekt biologiczny zależy od typu receptora, do którego zostanie przyłączony ligand. Dodatkowo wykazano,

że izoflawony wykazują właściwości selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych, co oznacza, że ich oddziaływanie na receptor może mieć charakter agonistyczny lub antagonistyczny, zależnie od narządu, na którym receptory te występują [27, 28]. Mają również zdolność wiązania wolnych rodników, indukcji metylacji DNA oraz regulacji cyklu komórkowego i apoptozy [29].

Wyniki badań dotyczących wpływu fitoestrogenów na zdrowie kości wciąż są niejednoznaczne. Niektóre badania wskazują na brak związku między spożyciem fitoestrogenów a zdrowiem kości. Metaanaliza randomizowanych badań klinicznych u ludzi wykazała niewielką zależność między zwiększonym spożyciem izoflawonów sojowych, a wzrostem gęstości mineralnej kości [30, 31]. Inne opracowania dowodzą korzystnego wpływu fitoestrogenów na metabolizm tkanki kostnej [32-34]. Podkreślić należy, że osteoprotekcyjny wpływ fitoestrogenów jest wielokierunkowy. Dotyczy on zarówno hamowania resorpcji tkanki kostnej [35, 36], pobudzenia jej formowania [32, 34] oraz regulacji wchłaniania wapnia z przewodu pokarmowego [37, 38]. Dane te wskazują, że fitoestrogeny mogą zmniejszać ryzyko wystąpienia osteoporozy, która jest chorobą charakteryzującą się utratą masy kostnej i osłabieniem struktury kości [39-41]. Pośrednim dowodem wskazującym na słuszność tej tezy jest przykład społeczeństw, gdzie dieta jest bogata w fitoestrogeny. Taka dieta dominuje u Azjatów, a osteoporoza jest rzadziej diagnozowana w porównaniu do społeczeństw zachodnich [31, 42]. Należy jednak pamiętać, że osteotropowe efekty stosowania fitoestrogenów mogą wynikać z innych czynników, takich jak zastosowana dawka, czas ich spożycia i indywidualna wrażliwość organizmu.

1.3. Fitoandrogeny.

Pojęcie fitoandrogenów jest stosunkowo nowe w porównaniu do fitoestrogenów. Fitozwiązki te to składniki roślin o strukturze podobnej do androgenów. Posiadają słabą aktywność hormonalną i mogą wiązać się z receptorami androgenowymi, powodując ten sam rodzaj odpowiedzi, który wywoływałby hormon. Na podstawie sposobu, w jaki wywierają swoje działanie, tradycyjne postrzeganie fitoterapeutycznych substancji jako wyłącznie "fitohormonów" uważać należy za zbyt zawężone. Uwzględniając odmienność mechanizmów działania różnych fitoandrogenów istnieje zasadność ich podziału na trzy podstawowe klasy: fitoandrogeny prawdziwe, fitoandrogenogeniki oraz funkcjonalne mimetyki androgenów [43].

Prawdziwe fitoandrogeny to składniki roślin, których chemiczna struktura podobna jest do androgenów. Posiadają one aktywność hormonów i mogą wiązać się z receptorami androgenowymi, powodując ten sam rodzaj odpowiedzi, który wywoływałby hormon [44]. Chociaż rodzaj odpowiedzi jest taki sam, intensywność może być słabsza, a czas trwania odpowiedzi może być inny. Przykładem może być protodioscyna – steroidowy, organiczny związek chemiczny z grupy saponin, występujący w wielu roślinach, głównie z rodzajów: *Tribulus*, *Trigonella* i *Dioscorea*, który w tradycyjnej medycynie chińskiej uważany jest za lek wspomagający funkcje rozrodcze. Ze względu na swoją specyficzną strukturę steroidową, wiąże się i aktywuje receptor androgenowy [23]. Do tej grupy metabolitów zalicza się również, wartościowe klinicznie, "fitoantyandrogeny", związki wiążące się z receptorami androgenowymi, lecz wywołującymi odpowiedź antagonistyczną [45]. Ciekawa jest również, występująca w roślinach grupa, związków fitohormonogenicznych dla androgenów. Wywierają one wpływ polegający na wzmocnieniu zdolności organizmu do

wytwarzania androgenów (fitoandrogeniczność). Rośliny zawierające związki fitoandrogeniczne mogą mieć bezpośredni wpływ na tkanki docelowe, zwiększając produkcję hormonów w gonadach lub mogą oddziaływać na aktywność funkcjonalnej osi podwzgórze-przysadka-jądra, jak np. Suo Yang (*Cynomorium songaricum*) [46]. Nie bez znaczenia jest również ich regulujący wpływ na konwersję androgenów do estrogenów lub ich połączenie z globulinami wiążącymi sterydowe hormony płciowe (SHBG) lub albuminami, tym samym wpływać na poziom testosteronu we krwi (np. korzeń pokrzywy) [47, 48]. Kolejna grupa związków tzw. funkcjonalne mimetyki androgenów mogą wywoływać odpowiedź fizjologiczną taką samą jak hormon, który imitują, przy czym nie muszą wiązać się z receptorem androgenowym. Te funkcjonalne mimetyki androgenów mogą naśladować jedną lub więcej funkcji androgenów. Na przykład damiana (*Turnera diffusa*), powszechnie stosowana w chińskiej medycynie tradycyjnej jako afrodyzjak, ma zdolność do zwiększania napływu krwi do ciał jamistych prącia poprzez swoje właściwości rozszerzające naczynia krwionośne, dzięki uwalnianiu tlenku azotu. Sugeruje to, że damiana wykazuje funkcjonalne podobieństwo do testosteronu [49]. Dodatkowo damiana jest inhibitorem aktywności aromatazy, metabolizującej testosteron do estradiolu [50].

1.3.1. Fitoandrogeny a zaburzenia seksualne.

W tradycyjnej medycynie chińskiej rośliny lecznicze, wymienione jako zawierające fitoandrogeny, są stosowane w terapii impotencji, bezpłodności i zaburzenia erekcji [51]. Ich przyjmowanie zalecane jest także dla poprawy krążenia krwi, w celu leczenia bólów dolnej części pleców, nocnych wytrysków, moczenia nocnego lub krwawień z pochwy. Ekstrakt z Suo Yang (*Cynomorium songaricum*) jest stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej w leczeniu zaburzeń seksualnych

i bezpłodności. Liu i in. (2012) zasugerowali, że *C. songaricum* może łagodzić zaburzenia zdrowia wynikające z wieku, zwłaszcza te związane z funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego, popędu seksualnego i funkcji rozrodczych. Jednak warunkiem sukcesu terapeutycznego jest rozpoczęcie stosowania tej rośliny w młodszym wieku [52]. W 2010 roku Yang i in. opisali pobudzający wpływ ekstraktów z *C. songaricum* na spermatogenezę w jądrach szczurów, warunkowaną stymulacyjnym wpływem czynnika neurotroficznego pochodzenia glejowego (GDNF), wytwarzanego w komórkach Sertoliego [53]. Badanie przeprowadzone przez Cherdshewasart i in. [54] sugeruje możliwość stosowania fitoandrogenów zawartych w *Butea superba* w leczeniu zaburzeń erekcji, a medyczna skuteczność tej rośliny wynika ze zwiększenia zdolności rozkurczowej mięśni gładkich ciał jamistych, poprzez hamowanie fosfodiesterazy cAMP. Zaburzenia erekcji spowodowane są również upośledzoną produkcją i działaniem tlenku azotu (NO) [55, 56]. W roku 2010 Koizumi i in. wykazali, że icariin izolowany z *Epimedii herba* stymuluje uwalnianie NO poprzez aktywację eNOS zależną od receptora androgenowego (AR) w komórkach śródbłonka naczyniowego pępowiny ludzkiej (HUVECs) na drodze zaangażowania szlaków PI3K/Akt i MAPK-ERK kinase (MEK)/ERK1/2 w fosforylację eNOS [83]. Źródłem NO jest rówież żeń-szeń, od tysięcy lat stosowany klinicznie w Chinach [57]. Badania in vitro wykazały, że ekstrakt z saponin żeń-szenia, wywierał relaksacyjny wpływ na mięśnie gładkie ciał jamistych królika, co sugeruje, że niektóre składniki tej rośliny mogą być donorami tlenku azotu (NO) [58, 59]. W tradycyjnej medycynie chińskiej żeń-szeń wzmacnia zdolności fizyczne, umysłowe i seksualne człowieka [60].

1.3.2. Fitoandrogeny a nowotwory.

Walka z nowotworami jest uważana za jedno z najważniejszych obszarów badań medycznych i immunologicznych. Niektóre fitoandrogeny były analizowane pod kątem ich potencjału antynowotworowego, który wynikać może ze zdolności do przenikania przez błonę komórkową i ingerowania w określone szlaki transdukcji sygnałów związanych z procesami, takimi jak stan zapalny, różnicowanie i przeżycie komórki, karcinogeneza i przerzuty [61]. Gan et al. (2004) badali hamujący wpływ *Fructus Lycii*, owocu *Lycium barbarum*, na wzrost guza nowotworowego. Obserwacje tych autorów dowiodły, że polisacharydy (LBP) z *L. barbarum* mogą zwiększać poziom interleukiny-2 (IL-2) i czynnika martwicy nowotworu-alfa (TNF-alfa), dwóch kluczowych cytokin mogących hamować wzrost guza. Na podstawie wyników tych badań stwierdzono, że LBP znacząco hamuje wzrost przeszczepialnego mięsaka S180 u myszy nosiciela [62] co sugeruje, że polisacharydy mogą wykazywać aktywność przeciwnowotworową.

1.3.3. Aktywność przeciwutleniająca fitoandrogenów.

Uszkodzenia oksydacyjne są istotnym czynnikiem etiologicznym wielu przewlekłych chorób człowieka, takich jak cukrzyca, nowotwory, miażdżyca, artretyzm, choroby neurodegeneracyjne oraz proces starzenia się. Wiele fitoandrogenów posiada aktywność przeciwutleniającą [63, 64]. Mai i in. (2012) opublikowali wyniki, przedmiotem których była ocena aktywności przeciwutleniającej *Rhizoma Cibotii* w badaniach *in vitro*. Autorzy udowodnili antyoksydacyjne właściwości tej rośliny, które w ich ocenie wynikają z obecności związków bioaktywnych, takich jak flawonoidy, kwasy fenolowe i polisacharydy. *Rhizoma Cibotii* wykazała silną zdolność do neutralizacji wolnych rodników, w tym rodników ponadtlenkowych i rodników hydroksylowych oraz skutecznie hamowała peroksydację lipidów [65].

Oprócz *Rhizoma Cibotii* również inne rośliny lecznicze wykazują istotną aktywność przeciwutleniającą. Na podkreślenie zasługuje, znacznie lepiej poznany, ekstrakty z liści *Ginkgo biloba*. Wykazano,że ekstrakt ten wykazuje zdolność do neutralizacji wolnych rodników i zmniejszenia stresu oksydacyjnego w różnych tkankach. Właściwości przeciwutleniające *Ginkgo biloba* są przypisywane flawonoidom, terpenoidom i innym związkom fenolowym obecnym w ekstrakcie [66]. *Curcuma longa*, powszechnie znana jako kurkuma, zawiera kurkuminę jako swoją aktywną substancję. Została ona szeroko zbadana pod kątem właściwości przeciwutleniających, a otrzymane wyniki wskazują na jej zdolność do neutralizacji wolnych rodników, hamowania procesów utleniania i ochrony komórek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [67].

1.3.4. Fitoandrogeny a otyłość i związany z nią zespół metaboliczny.

Testosteron, oprócz swojej roli jako kluczowego hormonu steroidowego w fizjologii układu rozrodczego, pełni również ważną funkcję oddziałując regulacyjnie na wykorzystanie energii oraz kontrolę licznych szlaków metabolicznych w komórkach, w tym retencję azotu i regulację adipogenezy [68-70]. Poprzez zwiększanie i utrzymanie masy mięśniowej oraz redukcję masy tłuszczowej, odgrywa istotną rolę w regulacji składu ciała [71, 72]. Niedobór androgenów prowadzić może do rozwoju insulinooporności, cukrzycy typu II oraz zespołu metabolicznego [73, 74]. Stwierdza się również zwiększone odkładanie tkanki tłuszczowej, szczególnie trzewnej, pełniącej funkcję największego narządu wydzielniczego, produkującej liczne adipokiny, w tym również cytokiny prozapalne [75-78]. Począwszy od 20. aż do 70. roku życia mężczyźni tracą ok. 12 kg masy mięśniowej [79]. Prowadzi to do obniżenia wydolności wysiłkowej, a w konsekwencji jest przyczyną stale narastającego zmęczenia fizycznego. Co ważne, redukcja masy mięśniowej, warunkująca zmniejszenie obciążenia kośćca

ma negatywne oddziaływanie na jakość tkanki kostnej, co związane jest z spadkiem jej gęstości mineralnej. Podkreślić należy, że testosteron jest tylko jednym z czynników odpowiedzialnych za ubytek masy mięśniowej związanej z wiekiem [80, 81]. Zmniejszenie masy mięśniowej, otyłość brzuszna, ścieńczenie skóry mogą być również wykładnikami niedoboru hormonu wzrostu i siarczanu dehydroepiandrosteronu [82, 83]. Podawanie testosteronu prowadzi do redukcji nagromadzonej tkanki tłuszczowej, zwiększenia wrażliwości na insulinę oraz zmniejsza ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [84, 85]. Jednak farmakoterapia androgenami, takimi jak: testosteron, dihydrotestosteron (DHT) i sterydy anaboliczne, może wiązać się z możliwością wystąpienia skutków ubocznych, takich jak nadciśnienie, hyperandrogenizm czy przerost, a nawet rak gruczołu krokowego. Wydaje się, że fitoandrogeny mogą oddziaływać na receptory androgenowe (AR) bez ograniczeń, jakie wiążą się z terapią zastępczą syntetycznymi androgenami, co umożliwia leczenie chorób spowodowanych niedoborem testosteronu wynikających z otyłości oraz chorób metabolicznych z nią związanych [86].

1.3.5. Fitoandrogeny a kości.

Mimo, że badania nad wpływem fitoandrogenów na organizm człowieka i zwierząt zyskują coraz większą popularność, to brak jest wyczerpujących danych dotyczących ich oddziaływania na metabolizm tkanki kostnej. Istnieją tylko nieliczne informacje wskazujące na korzystny wpływ fitoandrogenów na tkankę kostną. Takie działanie wykazuje *Eucommia ulmoides*, o której w tradycyjnej medycynie chińskiej wspomina Zhong-Yao, a w japońskiej Kampo. Według tych źródeł *Eucommia ulmoides* wzmacnia układ kostny, czyniąc go silniejszym i bardziej odpornym. Roślina ta wzmacnia również układ mięśniowy poprzez poprawę jakości i siły mięśniowej [45].

O korzystnym wpływie fitoandrogenów na tkankę kostną w warunkach doświadczalnej osteopenii donoszą również inni autorzy [52, 61, 87].

1.4. Pyłek sosnowy.

Pyłek sosnowy (*Pinus pollen*) to suchy, drobny, jasnożółty proszek. Pochodzi głównie z gatunków *Pinus massoniana Lamb.*, z *Pinus tabuliformis Carriere* i innych roślin tego samego gatunku. Wytwarzany jest przez kwiatostany męskie znajdujące się w skupiskach na końcach gałęzi tzw. klastrach w okresie kwitnienia sosny, tj. w maju. Pojedynczy kwiatostan jest w stanie wyprodukować ok. 5 mln cząstek pyłku, który następnie przenoszony przez wiatr trafia na kwiaty żeńskie. Jego obecność można obserwować po krótkotrwałych opadach deszczu, gdyż znajduje się wówczas na brzegach kałuż tworząc żółtą powłokę – tzw. „siarczane deszcze" [88]. W medycynie chińskiej pyłek sosny znany jest jako "Songhuafen" lub "Songhuang". Po raz pierwszy wspomniano o nim w dziele Xin Xiu Ben Cao z epoki Tang. Od tysięcy lat stosuje się go w produktach leczniczych jako suplement diety [89]. Pyłek sosnowy jest bogaty w fitoandrogeny. Ma również reputację "naturalnego skarbca mikroelementów". Zawiera liczne aminokwasy, minerały, witaminy, enzymy i flawonoidy [90]. Szerzej właściwości zdrowotne pyłku sosnowego opisano po raz pierwszy w „Shen Nong's Herbal Classic", chińskiej książce o rolnictwie i roślinach leczniczych, w której wskazano, że pyłek sosnowy może zwiększać oddawanie moczu, pobudzać krążenie krwi oraz „rozpraszać zimno lub gorąco w sercu i brzuchu", a jeśli stosowany jest przez długi czas, może "rozjaśniać ciało" i przedłużać życie. Przypisuje się mu również zdolność do uzupełniania energii qi, która w tradycyjnej medycynie chińskiej uważana jest za filar prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Shizhen Li, żyjący w latach 1518 - 1593, znakomity chiński znawca medycyny tradycyjnej w okresie

panowania dynastii Ming, w swoim monumentalnym dziele *Encyklopedia korzeni i roślin* (*Bencao gangmu*), będącym farmakopeą chińskiej medycyny tradycyjnej zapisał, że „pyłek sosny ma słodki smak, ciepłe działanie i jest nietoksyczny. Może on odżywiać serce i płuca, uzupełniać energię qi, rozpraszać wiatr i zatrzymywać krwawienie" [90, 91]. Współczesne badania rozszerzają zdrowotne właściwości pyłku, dowodząc jego immunomodulacyjnego wpływu na organizm, ochronnego oddziaływania na wątrobę, działania przeciwnowotworowego, przeciwutleniającego, przeciwzapalnego, zmniejszającego efekty starzenia się, przeciwzmęczeniowego oraz zmniejszającego stężenie lipidów i glukozy we krwi [90, 92-95].

Zgodnie z danymi podawanymi przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) pyłek sosnowy bogaty jest w takie aminokwasy jak: arginina, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, cysteina, tryptofan oraz tyrozyna. Ponadto, w jego składzie znajdują się witaminy m.in. D3 oraz witaminy z grupy B. Zawiera dodatkowo selen, żelazo, mangan, miedź, fosfor, małe ilości potasu, flawonoidy, fitosterole, cukry, kwas fenolowy, lignany oraz alfa oraz beta-pinen, borneol, octan bornylu, limonen, izoborneol, torpineol, karen, felandreny, kariofilen, kamafen. Najważniejszą cechą wydaje się jednak obecność w jego składzie testosteronu oraz dehydroepiandrostenonu [88, 96].

Morgan i in. (2012) wykazali, że z 0,1 g *Pinus tabulaeformis* można wyizolować 27 ng testosteronu. Zawartość DHEA w pyłku sosny czarnej (*Pinea Nigra*) określona została na poziomie 0,1 µg w 10 g pyłku [97]. Uwzględniając wcześniej przedstawioną klasyfikację androgenów, to pyłek sosnowy należy do grupy fitoandrogenów prawdziwych.

Badania dotyczące wpływu pyłku sosnowego na organizm ludzi i zwierząt nie są liczne. Uwagę zwraca praca Aziz i in. [98], którzy wykazali wzrost stężenia testosteronu oraz DHEA w osoczu krwi tapii nilowej w następstwie podawania pyłku sosnowego w diecie. Gen-Xiang Mao i in. [89] dowodzą, iż pyłek sosnowy opóźnia replikacyjne starzenie się diploidalnych ludzkich fibroblastów - 2BS, czego wynikiem jest zwiększona proliferacja komórek, obniżona aktywność związanej ze starzeniem β-galaktozydazy (SA-B-Gal) oraz odwrócona ekspresja markerów starzenia tj.: p53, p21Waf1 , p16INK4a, PTEN i p27Kip1 w późnych komórkach PD. Kyung-Hee Lee i in. indukowali zapalenie stawów poprzez immunizację podskórną kolagenem bydlęcym typu II (CIA - Collagen-Induced Arthritis) u myszy, u których przebieg zmian zapalnych najbardziej przypomina te obserwowane u ludzi [99]. Następnie podawano zwierzętom ekstrakt z pyłku sosnowego doustnie w dawkach 100 i 200 mg/kg m.c. przez okres 49 dni. Obrzęk łap oraz zapalenie stawów były znacznie mniejsze w grupie doświadczalnej, której podawano ekstrakt. Dodatkowo stwierdzono, iż zwierzęta otrzymujące dawkę 100 mg/kg m.c. dziennie wykazywały obniżenie poziomu czynnika reumatoidalnego, białka karbonylowego, TNF-alfa, I-1beta, IL-6, dialdehydu malonowego i produktów glikacji w surowicy krwi. Zauważono również, iż dochodziło do zmian w stężeniu poszczególnych frakcji lipidowych osocza, gdzie poziom LDL ulegał obniżeniu [99]. Dane te mogą sugerować, iż pyłek sosnowy ma działanie przeciwzapalne, które może być wykorzystywane w stanach przewlekłych. Za ciekawe uznać należy wnioski płynące z oceny wpływu pyłku sosnowego jako czynnika zmniejszającego doznania bólowe różnego pochodzenia. Eun-Mi Choi i in. [100] indukowali reakcje bólowe u myszy w obrębie jamy brzusznej, powodowane kwasem octowym lub formaliną (podawana w formie do lizania) oraz przeprowadzali test gorącej płytki. Wykazali, że podawanie doustnie ekstraktu etanolowego pyłku

sosnowego w dawkach 100 i 200 mg/kg istotnie hamowało fazy formalinowego testu bólu u zwierząt. Sugeruje to, iż polifenole zawarte w pyłku mogą mieć zbliżone działanie do aminopiryny oraz indometacyny, które charakteryzują się działaniem przeciwbólowym oraz przeciwzapalnym.

W dostępnej literaturze brak jest natomiast opracowań, które wyjaśniłyby efekty stosowania pyłku sosnowego na metabolizm tkanki kostnej.

1.5. Rola androgenów w metabolizmie tkanki kostnej samców.

Fizjologicznie wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga jest dwuetapowe. Rozpoczyna się u ludzi w ok. 6 tyg. życia płodowego, a następnie w okresie dojrzewania. Jego szczyt przypada ok. 20 r.ż. Natomiast obniżanie się poziomu testosteronu wraz z wiekiem, wynikające ze zmniejszającej się liczby komórek Leydiga, wynosi ok. 0,8-1% każdego roku [77, 101]. DHEA wytwarzany jest głównie przez warstwę siatkowatą kory nadnerczy, ale miejscem jego syntezy są także jądra, jajniki, skóra i mózg. Nadnerczowa synteza i wydzielanie DHEA podlega kontroli osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej [102, 103]. Siarczanowy ester DHEA (DHEAS) jest wyłącznie wytwarzany z DHEA w nadnerczowej strefie siatkowatej, w której aktywność sulfotransferazy jest bardzo wysoka. Osoba dorosła wydziela codziennie 4 mg DHEA i 25 mg DHEAS. Sulfataza w tkankach zmienia DHEAS w DHEA, który następnie przekształcany jest w aktywne hormony płciowe, takie jak testosteron i estradiol [104, 105]. Poziomy DHEA i DHEAS w surowicy wzrastają od początku drugiej do czwartej dekady życia, a potem rozpoczyna się powolny spadek ich poziomu.

Spadek poziomu androgenów u samców, podobnie jak obniżenie stężenia estrogenów u samic, prowadzi do zmian zanikowych tkanki kostnej [106, 107]. Blisko

osiemdziesiąt lat temu Albright i Reifenstein [108], jako pierwsi, stwierdzili korzystny wpływ podawania testosteronu w terapii osteoporozy u mężczyzn. Obecnie wiadomo, że androgeny wpływają na funkcjonowanie osteoblastów regulując ich proliferację, różnicowanie, dojrzewanie, mineralizację i ekspresję genów. Ich oddziaływanie na układ kostny zachodzi na drodze bezpośredniego pobudzenia receptorów androgenowych, jak również pośrednio przy udziale czynników wydzielanych parakrynnie i autokrynnie. Receptory androgenowe występują zarówno w osteoblastach, jak i osteoklastach. Ich obecność stwierdzona została również w prekursorowych komórkach mezenchymalnych, których dalsze różnicowanie umożliwia rozwój mięśni, kości lub tkanki tłuszczowej. Dlatego też wyrazem aktywności androgenów jest stymulowanie rozwoju tych pluripotencjalnych komórek w kierunku mieloblastów i osteoblastów z jednej strony i hamowanie rozwoju komórek tłuszczowych z drugiej [109, 110]. Interakcja testosteronu ze specyficznym receptorem przebiegać może w dwojaki sposób. Pierwszy polega na połączeniu testosteronu bezpośrednio z receptorem androgenowym (AR). Drugi zaś związany jest z uprzednią konwersją tego hormonu do 5α-dihydrotestosteronu (5α-DHT) przy udziale 5α-reduktazy i dopiero wtedy ligand przyłączany jest do AR. Dodatkowo testosteron (ale nie 5α-DHT) może, za pośrednictwem aromatazy, ulegać przekształceniu do estradiolu [111, 112]. Obecność w tkance kostnej zarówno aromatazy, jak i 5α-reduktazy, została dobrze udokumentowana [113, 114]. Powstający 17β-estradiol łączy się ze specyficznymi receptorami estrogenowymi, inicjując tym samym efekty typowe dla działania hormonu [115]. Androgeny są tym samym prekursorem hormonów estrogennych.

Rola estrogenów w fizjologii tkanki kostnej jest również wielokierunkowa i polega na oddziaływaniu pośrednim, poprzez inne hormony i cytokiny oraz bezpośrednim receptoralnym. Receptory estrogenowe (ERs) są zlokalizowane w osteoblastach, osteocytach oraz chondrocytach płytki wzrostowej. Ich koncentracja w osteoblastach wynosi ok. 200 – 1000/komórkę. Znaczenie estrogenów dla prawidłowego formowania tkanki kostnej potwierdzają obserwacje opisane u samców z niedoborem estrogenów wynikającym z braku aromatazy. Samce te cechowały się niską gęstością mineralną kości (BMD). Dodatkowo, Rochira i in. [116] opisali efekty kostne wyłącznego stosowania testosteronu w porównaniu z łącznym podawaniem testosteronu i estradiolu u samców z deficytem aromatazy. W badaniach tych autorzy dowiedli, że testosteron gwarantuje formowanie kości jedynie w obecności estrogenów. Dodatkowo wykazano, że kościotworzenie zachodzi w następstwie pobudzenia ER-alfa, a nie ER-beta [109]. Badania przeprowadzone na myszach obydwu płci, u których selektywnie usunięty został ER-alfa w osteoklastach, wskazują na intensyfikację resorpcji tkanki kostnej wyłącznie u samic, w stopniu podobnym do obserwowanego u kobiet z osteoporozą pomenopauzalną [117, 118], co dowodzi, że aktywacja ER-alfa w osteoklastach jest istotna dla hamowania resorpcji kości u samic myszy. U samców natomiast intensyfikacja resorpcji kości następowała dopiero po zakłóceniu funkcjonowania AR [106, 119]. ER-alfa i AR mają kluczowe znaczenie w podczas formowania tkanki kostnej. Potwierdzają to prace na transgenicznych samcach myszy z wyłączonym receptorem estrogenowym alfa (ER-alfa) lub receptorem androgenowym (AR). Wykazano w nich ograniczenie formowania tkanki kostnej w wyniku unieczynnienia choćby jednego z tych receptorów [120-122]. Z obserwacji tych wynika, że zarówno metabolizm sterydowych hormonów płciowych, jak i wpływ androgenów i estrogenów są istotne dla dojrzewania i homeostazy układu kostnego u samców [123-125]. Zarówno

androgeny jak i estrogeny hamują resorpcję tkanki kostnej [111, 126] oraz pełnią kluczową rolę w tworzeniu tkanki kostnej i utrzymaniu jej masy [122, 127]. Steroidy gonadalne mogą bezpośrednio hamować rekrutację, dojrzewanie i aktywność metaboliczną osteoklastów i/lub stymulować śmierć komórek osteoklastycznych lub wpływać pobudzająco na sygnalizację antyresorpcyjną komórek osteoblastycznych [115, 128].

Pobudzenie receptorów estrogenowych alfa wydaje się być również zaangażowane podczas obciążenia mechanicznego kośćca, jednego z najważniejszych bodźców fizjologicznych wpływających na tworzenie kości. Armstrong i in. [129] wykazali, że sygnalizacja za pośrednictwem szlaku Wnt/β-katenina jest elementem wczesnej odpowiedzi osteoblastów na naprężenia mechaniczne i że droga ta prawdopodobnie wymaga pobudzenia ER-alfa. Wciąż nie ustalono, w jakim stopniu androgeny i składniki szlaku oddziaływania za pośrednictwem AR wpływają na sygnalizację układu Wnt/β-katenina lub przekazują reakcje osteoblastów na obciążenie, ani w jakim stopniu mechanizm ten może być zaangażowany w stymulację formowania tkanki kostnej warunkowanego przez androgeny. Jednak Liu i in. w badaniach *in vitro* wysunęli koncepcję, że to dihydroksytestosteron (DHT) może stymulować różnicowanie osteoblastów poprzez oddziaływanie na sygnalizację Wnt [130]. Rozważając zależność pomiędzy formowaniem tkanki kostnej, a obciążeniem mechanicznym uwzględnić należy badania Oury i in. [131]. Praca tego zespołu zasługuje na szczególne podkreślenie ze względu na udział w nich polskich naukowców. W 2011 r wykazali oni obecność receptorów dla osteokalcyny na komórkach Leydiga. Osteokalcyna to niekolagenowe białko odpowiedzialne za mineralizację kości. Wytwarzana jest przez osteoblasty, odontoblasty

oraz chondrocyty [132]. Jej poziom wzrasta m. in. w następstwie zwiększonej reakcji osteoblastów na obciążenie mechaniczne [133]. Pobudzenie specyficznych receptorów na komórkach Leydiga przez osteokalcynę skutkuje zwiększonym wydzielaniem testosteronu. Podkreślić należy, że przez wiele lat osteokalcynę utożsamiano wyłącznie z tkanką kostną, identyfikując ją jako białko o tkankowym znaczeniu. Wspomniane badania stawiają zaś osteokalcynę w grupie hormonów [134, 135].

Sterydowe hormony płciowe pełnią istotną rolę w jelitowej absorpcji wapnia oraz jego retencji w tkance kostnej [136]. Na podkreślenie zasługuje wpływ tych hormonów na wzrost aktywności 1α-hydroksylazy, enzymu odpowiedzialnego za hydroksylację $25(OH)D_3$ do $1,25(OH)_2D_3$ [137]. Z drugiej strony, istnieją doniesienia wskazujące na udział $1,25(OH)_2D_3$ we wzroście aktywności aromatazy w osteoblastach [138].

Znamiennym jest także oddziaływanie sterydów gonadalnych na syntezę i wydzielanie GH oraz IGF-I. Zależność ta ma charakter dwukierunkowy, w którym GH i IGF-I pobudzają gonady do syntezy i sekrecji sterydowych hormonów płciowych, co wzmacnia ich wpływ osteotropowy [139]. Na syntezę i wydzielanie GH mają wyłącznie wpływ androgeny mogące ulegać aromatyzacji. Androgeny nie podlegające temu procesowi, takie jak oksandrolon czy też 5α-dihydrotestosteron, nie wpływają na wydzielanie GH [140, 141]. Testosteron pobudza syntezę i wydzielanie GH i IGF-I w sposób systemowy. Polega to na tym, że wzmaga syntezę IGF-I w tkance kostnej, zwiększa jego poziom w osteoblastach, intensyfikuje wzrost chrząstki nasadowej i mineralizację macierzy kostnej oraz zwiększa oddziaływanie troficzne niektórych białek wiążących insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBPs – insulin-like growth factor binding proteins) [142, 143]. Estradiol natomiast zwiększa syntezę IGF-I

w osteoblastach oraz ekspresję receptorów dla IGF-I, a zmniejsza produkcję IGFBP-4 i -6, wykazujących antagonistyczne, względem IGF-I, działanie w odniesieniu do tkanki kostnej [2005]. Synteza białek wiążących insulinopodobny czynnik wzrostu (IGFBPs) pobudzana jest również przez GH [144]. Białka te pełnią podwójną rolę. Z jednej strony, wykazując wysokie powinowactwo do IGF-I i IGF-II są ich transporterem osoczowym i regulatorem aktywności metabolicznej, wydłużając ich okres półtrwania [145-147]. Natomiast z drugiej, wpływają one na rozwój układu kostnego w sposób autonomiczny, tj. niezależny od IGF [111]. Dodatkowo kontrolny wpływ GH na syntezę białek IGFBP, przejawia się hamującym jego wpływem na powstawanie białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 4 (IGFBP-4), a pobudza syntezę IGFBP-2, -3 oraz -5. Te ostatnie białka wiążące IGF-I stymulują komórki kostne bezpośrednio lub poprzez IGF-I [111].

Po za wspomnianymi aspektami wpływu hormonów płciowych wspomnieć należy, że są one głównymi determinantami odmienności płciowej w budowie kośćca [148]. Zróżnicowanie to związane jest z rozwojem układu kostnego, kształtem i budową kości, ale również odmiennym przebiegiem zmian zanikowych tkanki kostnej, wynikających z braku hormonalnej aktywności gonad [149].

1.6. Osteoporoza u mężczyzn.

Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia osteoporoza to układowa choroba szkieletu, charakteryzująca się niską masą kości, zaburzoną mikroarchitekturą tkanki i zwiększoną podatnością kości na złamania. Przez długi czas osteoporoza uważana była za jeden z głównych problemów zdrowotnych, dotyczący jednak wyłącznie kobiet [150-152]. Tymczasem złamania osteoporotyczne występują również u mężczyzn [153-155]. Co więcej, wzrost występowania osteoporozy i złamań

w ostatnich dekadach był bardziej wyraźny u mężczyzn niż u kobiet. W Stanach Zjednoczonych, między początkiem lat 90. a połową roku 2000., odsetek mężczyzn powyżej 50 roku życia z osteoporozą i osteopenią podwoił się osiągając odpowiednio 4% i 38% populacji [107, 156]. Szansa na to, że mężczyzna dozna złamania związanego z osteoporozą w trakcie swojego życia jest większa niż szansa na rozwinięcie raka prostaty. W roku 2000, 40% z 9 milionów złamań, które wystąpiły na świecie, dotyczyło mężczyzn [157]. Ponadto, prognozuje się wzrost liczby złamań w obrębie biodra u mężczyzn o 310% do 2050 roku. W przeciwieństwie do kobiet, gdzie menopauza wiąże się z dość gwałtownym spadkiem poziomu estrogenów, poziom androgenów u mężczyzn maleje stopniowo i wolniej. Przyspieszenie tego procesu może wystąpić, zwykle w późniejszym wieku (po 65-70. roku życia), co skutkuje większą predylekcją do złamań [154, 158]. Obniżenie funkcji endokrynnej jąder zaistnieć może również w przebiegu innych chorób (np. hyperprolaktynemia) oraz z powodu stosowanych leków [154, 159-162]. Zmniejszenie gęstości mineralnej kości (BMD) i zwiększone ryzyko złamań stwierdzane jest również przy wzroście stężenia globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG) przy jednoczesnym obniżeniu poziomów wolnego testosteronu [163, 164]. Pamiętać również należy o estrogenach, których rola została opisana powyżej. Ich odpowiedni poziom ma kluczowe znaczenie dla osiągnięcia szczytowej masy kostnej, a niedobór jest bezpośrednio związany z zwiększonym remodelowaniem i utratą masy kostnej u mężczyzn [165-167]. Pacjenci, u których występuje kombinacja niskich poziomów estradiolu i wolnego testosteronu, są najbardziej narażeni na utratę masy kostnej i złamania [163, 164, 168-170]. Również obniżone stężenie dehydroepiandrosteronu (DHEA) wiąże się ze zmniejszoną gęstością mineralną kości [171, 172].

Oprócz aspektów mechanicznych i hormonalnych, istnieją również te związane bezpośrednio z procesem starzenia się. U osób starszych cytokiny zapalne mogą prowadzić do zwiększenia aktywności osteoklastów i hamowania osteoblastów [173-175]. Ważny jest również niedobór witaminy D wynikający ograniczeń dietetycznych, rzadszą ekspozycją na promienie słoneczne i niższą zdolnością skóry do przekształcenia 7-dehydrocholesterolu w cholekalcyferol [176, 177]. Mniejsza jest również sprawność układu mięśniowego, co zwiększa ryzyko upadków oraz złamań u starszych mężczyzn [178, 179].

Ze względu na lokalizację zmian zanikowych tkanki kostnej wyróżnia się jej dwie postacie: osteoporozę miejscową spowodowaną m.in. stanem zapalnym lub unieruchomieniem uszkodzonej kończyny oraz uogólnioną mogącą być wynikiem defektów metabolicznych, procesów inwolucyjnych czy unieruchomienia całego organizmu. Uwzględniając etiologię wyodrębniono trzy formy osteoporozy [150, 151]. Pierwsza z nich to osteoporoza młodzieńcza zwana również idiopatyczną, w której czynnik przyczynowy nie jest znany [180-182]. Najczęściej występującą jest osteoporoza pierwotna, będąca następstwem zmian zanikowych tkanki kostnej wynikających z wieku [183, 184]. Czynnikami intensyfikującymi jej rozwój są masa ciała, status hormonów płciowych i kalcytoniny, styl życia oraz aktywność fizyczna, palenie tytoniu, źle zbilansowana dieta, niedobory witaminy D_3 oraz wapnia [185]. Trzeci rodzaj to osteoporoza wtórna, powstająca jako powikłanie będące wynikiem innych chorób (nadczynność tarczycy, nadczynność przytarczyc, cukrzyca, przedwczesna menopauza lub andropauza, choroby układu pokarmowego przebiegające z zaburzeniami wchłaniania, przewlekłe zapalne choroby reumatyczne) lub stosowania niektórych leków (glikokortykosteroidy, leki przeciwpadaczkowe, heparyna, inhibitory

pompy protonowej [186-189]. Ta postać osteoporozy dotyczy osób w każdym wieku [190, 191].

Niedobór androgenów będący następstwem kastracji, hiperprolaktynemii, leczenia analogami GnRH z powodu raka prostaty prowadzi do hipotestosteronemii i tym samym utraty masy beleczkowej kości. Zaobserwowano, iż w przypadku 30% przypadków złamań kompresyjnych kręgosłupa i 68% złamań szyjki kości udowej stwierdzono niedobór testosteronu, co może mieć związek z postępującym wraz z wiekiem zmniejszaniem się stężenia testosteronu oraz androgenów nadnerczowych – DHEA [171, 172]. Spadek testosteronu i estrogenów o ok 50% w stosunku do wartości osiąganych przez młodych mężczyzn powoduje obniżenie wytrzymałości kości i tym samym predysponuje do złamań osteoporotycznych [101]. Rzadsze rozpoznawanie osteoporozy u mężczyzn, w porównaniu z kobietami, można wyjaśnić kilkoma czynnikami. Warto przypomnieć, że szczytowa gęstość mineralna kości (BMD) jest u mężczyzn od 8% do 10% wyższa niż u kobiet. Ponadto, charakterystyka rozwoju kości, szczególnie długich, u mężczyzn przyczynia się do ich większej wytrzymałości mechanicznej w porównaniu z kośćmi kobiet [149]. Zwiększony rozmiar kości jest wynikiem działania androgenów wpływających na formowanie podokostnowe, co warunkuje większą ich średnicę zewnętrzną [154, 156, 192]. U kobiet estrogeny ograniczają formowanie podokostnowe, efektem czego jest mniejsza średnica zewnętrzna. Zróżnicowanie płciowe wykazuje również mikrostruktura beleczek kostnych. U mężczyzn jest ona silniej rozbudowana i bardziej zagęszczona niż u kobiet[149]. Inny jest również mechanizm zmian zanikowych tkanki kostnej gąbczastej. U mężczyzn wraz z wiekiem obserwuje się zwiększenie przestrzeni między beleczkami. Rzadko stwierdza się zanik beleczek kostnych [193]. U kobiet natomiast zmiany zanikowe tkanki kostnej gąbczastej związane są ze zmniejszeniem

liczby beleczek kostnych, zanikiem ich ciągłości, a następnie całkowitą ich resorpcją [194-197]. Kolejna odmienność wynikająca z różnicy płci dotyczy dynamiki zmniejszania aktywności endokrynnej gonad. Jak już wspomniano wcześniej, u kobiet menopauza wiąże się z dość gwałtownym spadkiem poziomu estrogenów, natomiast obniżenie poziomu androgenów jest stopniowe i zdecydowanie wolniejsze. Silniejsze obniżenie wydzielania hormonów przez jądra obserwowane jest dopiero po 65-70 roku życia [198]. Warto zauważyć, że ryzyko złamania osteoporotycznego nasady głowy kości udowej u mężczyzn plasuje się na poziomie 6%, u kobiet natomiast wynosi ono 16-18% [199]. Spadek stężenia androgenów i estrogenów o ok. 50% w stosunku do wartości notowanych u młodych mężczyzn powoduje obniżenie wytrzymałości kości i tym samym predysponuje do złamań osteoporotycznych [101, 200]. Mniejsza częstotliwość występowania osteoporozy u mężczyzn niż u kobiet wynika z wyższej szczytowej masy kostnej, zbyt późnej diagnostyki (ok. 10 lat później niż u kobiet), krótszej długości życia oraz brakiem okresu przyspieszonej utraty masy kostnej [171]. Powikłania wynikające z osteoporozy skutkują jednak większą śmiertelnością mężczyzn, szczególnie w pierwszym roku po złamaniu głowy kości udowej [201-203].

Złotym standardem w diagnostyce obrazowej osteoporozy kobiet jest densytometria (ang. DXA – Dual X-Ray Absorptiometry). Badanie to, wykorzystując ołówkową lub wachlarzową wiązkę promieniowania RTG, dokonuje pomiarów kośćca w miejscach referencyjnych, tj., w obrębie kręgów lędźwiowych oraz szyjki kości udowych określając bezwzględną gęstość i zawartość mineralną tych kości oraz ich powierzchnię [204]. Dla określenia aktualnego stanu układu kostnego konieczne jest jednak wykonanie obliczeń pozwalających na wyznaczenie wartości T-score. Zgodnie z definicją WHO wartość T-score jest odchyleniem standardowym pozwalającym na zdefiniowanie, jaką część masy

kostnej utraciła pacjentka w stosunku do szczytowej masy kostnej młodych, zdrowych kobiet w wieku 25-40 lat [205, 206]. O ile wartość T-score mieści się w przedziale wskaźnika od -1 do -2,5, to taka zależność opisywana jest jako osteopenia, czyli fizjologiczny zanik kości. Wartości T-score niższa niż -2,5 świadczy o osteoporozie [187, 207]. Jak wspomniano, wskaźnik T-score jest odchyleniem standardowym od średniej szczytowej masy kostnej w populacji w określonym wieku [187]. Tak więc, żeby ten wskaźnik można było prawidłowo wyznaczyć musiano stworzyć bazę danych pomiarów densytometrycznych dużej populacji kobiet. Dla mężczyzn taka baza nie istnieje. I mimo odmienności budowy tkanki kostnej u obydwu płci, podczas badania DXA kośćca mężczyzn posługujemy się bazą utworzoną dla pań, co może być przyczyną niecałkowicie precyzyjnej diagnozy [208, 209]. Problemy dotyczą również leczenia osteoporozy u mężczyzn, gdyż nie wszystkie leki stosowane u kobiet mają dopuszczenie do użycia u mężczyzn [154, 210].

2. CEL PRACY

Osteoporoza u mężczyzn to istotny problem zarówno w aspekcie medycznym, jak i społecznym. Uwzględniając postępujący rozwój cywilizacyjny, wiążący się ze stale rosnącym poziomem życia, niską aktywnością fizyczną oraz niewłaściwym odżywianiem przewiduje się, że zaburzenia metaboliczne układu kostnego u mężczyzn będą coraz częściej diagnozowane. Wskazują na to dane liczbowe przytoczone w poprzednim rozdziale. Osteoporoza u mężczyzn i kobiet prowadzi do osłabienia struktury kości i zwiększenia jej podatności na złamania. Mimo podobieństw konsekwencji wynikających z degradacji tkanki kostnej, ich przebieg jest różny. Podkreślić należy również większą śmiertelność u mężczyzn, będąca konsekwencją powikłań np. w następstwie operacyjnego leczenia złamań szyjki kości udowej.

Mimo postępu w zakresie terapii zmian zanikowych tkanki kostnej, zauważalna jest tendencja powrotu do medycyny tradycyjnej i poszukiwania alternatywnych metod zapobiegania i leczenia osteopatii metabolicznych. Przykładem jest pyłek sosnowy będący bogatym źródłem androgenów i DHEA. Dlatego celem tych badań było określenie osteotropowego wpływu różnych dawek pyłku sosnowego, podawanego *p.o.* na metabolizm tkanki kostnej samców szczurów w warunkach rozwoju zmian zanikowych kości indukowanych obustronną orchidektomią. Uwzględniając znaczenie układu mięśniowego dla prawidłowego funkcjonowania kośćca oraz intensyfikację procesów katabolicznych mięśni po gonadektomii, równolegle podjęto badania nad wpływem różnych dawek pyłku sosnowego na powierzchnię oraz gęstość mięśni podudzia, a także kumulację w nich tkanki tłuszczowej. Jako zwierzę modelowe wykorzystane zostały szczury szczepu Wistar. Zwierzęta te są uznanym gatunkiem doświadczalnym w tego typu badaniach, a uzyskane efekty traktowane są jako referencyjne w odniesieniu do ludzi.

3. MATERIAŁ I METODY

Założone procedury eksperymentu oraz metodyka doświadczenia, po zaakceptowaniu przez Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na zwierzętach w Lublinie (uchwała nr 92/2019), zostały przeprowadzone w Ośrodku Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Analizę materiału biologicznego wykonano w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

3.1. Część doświadczalna realizowana z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych

Dojrzałe pod względem hodowlanym samce szczurów szczepu Wistar (n=40) o masie ciała 300 g ± 20 g zostały umieszczone w standardowych dla tego gatunku klatkach o powierzchni 840 cm^2 i wysokości 18 cm, po dwa zwierzęta w jednej klatce. Zwierzęta pochodziły z hodowli Ośrodka Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, posiadającego Certyfikat Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (numer rejestracyjny 24/2020/DPL z dnia 2 grudnia 2020 roku). Szczury utrzymywane były w optymalnych warunkach dla gatunku: temperatura (22 °C ± 2), oświetlenie (dzień/noc 12/12 h) oraz wilgotność (55% ± 5). Miały nieograniczony dostęp do standardowej paszy bytowej Altromin Standard 1320 (Altromin, Niemcy) oraz wody.

Tabela 1. Opis grup doświadczenia

Symbol grupy	Typ operacji	Podawany czynnik	Dawka i sposób podania
SHO (n=8)	Operacja rzekoma	Płyn fizjologiczny	0,5 ml/100 g m.c./24h *p.o.*
ORX-PhS (n=8)	Orchidektomia	Płyn fizjologiczny	0,5 ml/100 g m.c./24h *p.o.*
ORX-TEST (n=8)	Orchidektomia	Testosteron	7 mg/ kg masy ciała/7 dni *s.c.*
ORX-PP50 (n=8)	Orchidektomia	Pyłek sosnowy	Pyłek sosnowy 50 mg/kg m.c. w wodnej zawiesinie podawanej w objętości 0,5 ml/100 g m.c. *p.o.*
ORX-PP150 (n=8)	Orchidektomia	Pyłek sosnowy	Pyłek sosnowy 150 mg/kg m.c. w wodnej zawiesinie podawanej w objętości 0,5 ml/100 g m.c. *p.o.*

Szczury zostały podzielone wstępnie na dwie grupy. Pierwsza grupa (n=8) podlegała zabiegowi chirurgicznemu pozornej gonadektomii (SHO), zaś u samców w drugiej grupie (n=32) przeprowadzono zabiegi orchidektomii. Zabieg pozornej

gonadektomii (SHO) polegał na delikatnym przecięciu skóry worka mosznowego wzdłuż długiej osi każdego z jąder, w taki sposób, by nie uszkodzić tkanek gonad, a następnie brzegi ran były łączone szwem, do którego użyto nici niewchłanialnych 5-0. Podczas właściwej orchidektomii (ORX) wykonywano podobne cięcia jak powyżej opisano, przez które usuwane były jądra. Po izolacji jądra z worka mosznowego, nasieniowód podwiązywany był nićmi wchłanialnymi 4-0 celem uniknięcia krwawienia, a gonada amputowana. Celem zapobiegnięcia ewentualnym stanom zapalnym, bezpośrednio do rany wprowadzano antybiotyk w dawce 0,5 ml (Betamox, ScanVet Poland Sp. z o.o.), po czym brzegi rany zostały złączone szwem chirurgicznym przy użyciu nici niewchłanialnych 5-0. Po siedmiodniowej rekonwalescencji pooperacyjnej szczury podlegające zabiegom chirurgicznej gonadektomii (ORX) podzielone zostały losowo po 8 osobników w każdej z nich (Tabela 1). Po rozdzieleniu osobników rozpoczęto podawanie płynu fizjologicznego, testosteronu oraz dwóch dawek pyłku sosnowego, które trwało 60 dni. Masa ciała szczurów, stanowiąca podstawę do określenia dawek stosowanych substancji, mierzona była raz w tygodniu. Po tym okresie zwierzęta poddano eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Wyizolowano kości piszczelowe lewe, które oczyszczono z tkanek miękkich. Prawe kończyny miedniczne zostały oddzielone od tułowia w stawie biodrowym wraz ze skórą i mięśniami. Krew pobrana została z punkcji dosercowej, a po odwirowaniu otrzymano osocze do badań biochemicznych. Całość uzyskanego w toku doświadczenia materiału biologicznego została zamrożona w temp. -30 °C do dalszych analiz.

3.2. Densytometryczna analiza całego szkieletu i izolowanych kości piszczelowych

W badaniach użyty został densytometr firmy Norland Excel Plus (Norland, Ford Atkinson, Wi, USA), który wykorzystuje absorpcję promieniowania RTG o podwójnej energii (Dual Energy X-ray Absorptiometry DXA). Wykonanie pomiarów umożliwiło oprogramowanie Norland Illuminatus w wersji 4. 7. 6. Przeprowadzona została densytometryczna ocena całego szkieletu, w której określono zawartość mineralną, gęstość mineralną kośćca i jego powierzchnię (Ts.BMC, Ts.BMD oraz Ts.Ar) oraz zawartość mineralną, gęstość mineralną kośćca i powierzchnię izolowanych kości piszczelowych (t.BMC, t.BMD oraz t.Ar). Przed wykonaniem każdej serii pomiarowej urządzenie było kalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

3.3. Analiza izolowanych kości piszczelowych z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT).

Tabela 2. Parametry tomograficznej oceny tkanki kostnej zbitej i gąbczastej kości piszczelowych

Parametry całkowitego przekroju poprzecznego kości oraz tkanki kostnej zbitej określone w 50% długości kości	**Parametry całkowitego przekroju poprzecznego kości oraz tkanki kostnej gąbczastej określone w odległości 5 mm od powierzchni stawowej**

• Całkowita powierzchnia kości (Tot.Ar) • Całkowita zawartość mineralna przekroju kości (Tot.BMC) • Całkowita wolumetryczna przekroju gęstość mineralna przekroju kości (Tot.vBMD) • Grubość tkanki kostnej zbitej (Ct.Th) • Obwód zewnętrzny kości (Peri.C) • Obwód wewnętrzny kości (Endo.C) • Powierzchnia tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar) • Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD) • Zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej (Ct.BMC)	• Całkowita powierzchnia przekroju kości (Tot.Ar) • Powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej (Tb.Ar) • Całkowita wolumetryczna przekroju gęstość mineralna kości (Tot.vBMD) • Całkowita zawartość mineralna przekroju kości (Tb.BMC) • Wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.vBMC) • Zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej (Tb.BMC)

Tomograficzna analiza kości piszczelowych wykonana została przy pomocy obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT– Peripheral Quantitative Computed Tomography) Stratec XCT Research SA Plus (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Niemcy) z użyciem referencyjnego oprogramowania Stratec w wersji 6.20C. Urządzenie to pozwala na odrębną i niezależną analizę całego przekroju kości w dowolnie wybranym miejscu, a także na przeprowadzenie oddzielnej oceny tkanki kostnej gąbczastej i zbitej. W metodzie pQCT pomiar gęstości jest trójwymiarowy, co pozwala na określenie rzeczywistej (wolumetrycznej) gęstości mineralnej kośćca obwodowego, a wyniki wyrażane są w mg/mm³.

Miejsce analizy określono na podstawie skanowania wstępnego przeprowadzonego z prędkością 10 mm/s. Dzięki temu ustalona zastała linia referencyjna, stanowiąca punkt odniesienia do określenia właściwych miejsc pomiaru. Na tej podstawie linia referencyjna została zlokalizowana prostopadle do długiej osi oraz stycznie do powierzchni stawu kolanowego kości piszczelowej. Po ustawieniu

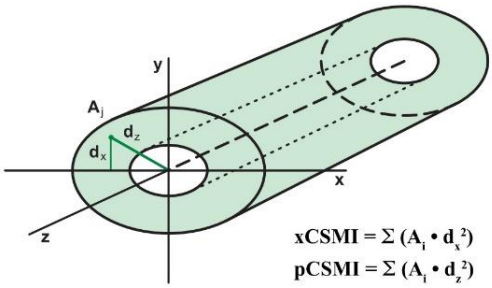
właściwych warunków pomiarowych dokonano skanowania z prędkością 3 mm/s. Tkanka kostna gąbczasta poddana została ocenie w części przynasadowej bliższej kości piszczelowych, w odległości 5 mm od powierzchni stawu kolanowego. Współczynnik progowy dla tkanki kostnej gąbczastej został ustawiony na 0,630 cm^{-1}. Z kolei analiza tkanki kostnej zbitej przeprowadzona została w połowie długości badanych kości (50%), przy współczynniku progowym 0,790 cm^{-1}. Urządzenie było kalibrowane referencyjnym wzornikiem hydroksyapatytowym, zgodnie z procedurą producenta przed każdorazową serią pomiarową. Parametry, które podlegały ocenie w bliższej części przynasadowej oraz w 50% długości kości piszczelowych zawarte zostały w Tabeli 2.

3.4. Analiza wytrzymałościowa izolowanych kości.

Izolowane kości piszczelowe podlegały badaniu wytrzymałościowemu z wykorzystaniem metody trójpunktowego testu ugięcia dla próbki o przekroju rury. Podstawą analizy kości, jako próbki o budowie rurowej jest pomiar obwodu wewnętrznego (śródkostnego) i zewnętrznego (podokostnowego) kości z wykorzystaniem pQCT. Algorytm programu sterującego pracą tomografu pozwala na obliczenie wartości obwodu wewnętrznego i zewnętrznego trzonu izolowanych kości poprzez uśrednienie grubości tkanki kostnej, a wyniki pomiarów przedstawia w formie modelu pieścieniowego. Na podstawie uzyskanych obwodów wyliczane są średnice trzonu kości (wewnętrzna i zewnętrzna), których wartości wprowadzane są do specjalnie opracowanej maski programu sterującego maszyną do badań wytrzymałościowych. W badaniach użyto urządzenia ZwickRoell Z010 (Zwick GmbH&Co. KG, Ulm, Niemcy), sterowanego przez program komputerowy testXpert II oraz wyposażonego w głowicę pomiarową o zakresie nacisku od 0 do 10

kN. Za punkt odniesienia przyjęto siłę obciążającą przy stałej prędkości głowicy pomiarowej V= 10 mm/min. Dla każdej kości oceniono siłę maksymalną (F_{max}), moduł elastyczności (E_{mod}) oraz granicę sprężystości (F_r). Wykorzystując pQCT określona została również wartość osiowego wskaźnika siła-odkształcenie (xSSI) umożliwiającego wyznaczenie przewidywanej wytrzymałości mechanicznej kości (Rycina 1).

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie zginającego (xCSMI) i skręcającego (pCSMI) momentu bezwładności przekroju pop rzecznego, obliczonych jako suma pola powierzchni (A_i) wybranych wycinków (vokseli) oraz kwadratu odległości (d_x, d_z) do odpowiedniej osi zginającej (x) lub skręcającej (z) oraz Wzór na obliczenie osiowego wskaźnika siła-odkształcenie (xSSI) kości.



$$xSSI = \sqrt[3]{\frac{\sum_{n=1}^{n}[xCSMI \bullet \frac{vBMD}{avBMD}]}{EcMx}}$$

Objaśnienia: BMD – wolumetryczną gęstość mineralną wycinka (voksela) avBMD – gęstość według norm fizjologicznych (1200 mg/cm^3), EcMx – maksymalny promień wzdłuż osi X.

3.5. Mikrotomograficzna (µ-CT) analiza morfometryczna tkanki kostnej gąbczastej

Tkankę kostną bliższej części przynasadowej kości piszczelowych analizowano za pomocą mikrotomografu komputerowego SkyScan 1174 (Bruker-SkyScan, Belgia), wyposażonego w kamerę VDS 1.3Mp FW o rozdzielczości 1024x1024, z zastosowaniem filtra aluminiowego 0,5 mm przy ustabilizowanych parametrach pracy lampy (50 kV i 800 µA). Skany każdej kości piszczelowej wykonywano w odległości 2,5 mm od proksymalnej płytki wzrostowej, przy stopniu rotacji 0,70° i czasie ekspozycji 2400 ms. Średnia liczba klatek wyniosła 4, wielkość piksela obrazu

odpowiadała 9,64 μm,a czas skanowania 1 h i 5 minut 50 sek. Rekonstrukcję kości piszczelowej wykonano przy użyciu oprogramowania NRecon 1.6.1.5 (SkyScan n.v., Kontich, Belgia). Analiza struktury wewnętrznej została wygenerowana za pomocą oprogramowania dedykowanego do tomografu Skyscan. Dla widoku 2D to DataViewer ver. 1.5.2.4, natomiast do analizy 3D wykorzystano CTVox ver. 3.1.2. Określone zostały następujące parametry: TV – całkowita objętość badanej próbki; BV – objętość tkanki kostnej; BS – powierzchnia tkanki kostnej; BS/TV – wskaźnik procentowej zawartości objętościowej tkanki kostnej; BS/BV – indeks określający zawartość powierzchni zajmowanej przez tkankę kostną do jej objętości; Tb.Th – grubość beleczek kostnych; Tb.Sp – średnia wielkość przestrzeni wolnych pomiędzy beleczkami; Tb.N – liczba beleczek kostnych przekroju kości.

3.6. Analiza tkanki mięśniowej z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT)

Analiza tkanki mięśniowej przeprowadzona została na prawej kończynie miednicznej, która w całości została odizolowana od tułowia w stawie biodrowym. Miejscem pomiarowym był fragment zlokalizowany w 50% długości kości piszczelowej. Dla dokładnego określenia miejsca pomiarowego izolowana kończyna udowa umieszczona została w specjalnym pozycjonerze, stanowiącym wyposażenie pQCT. Tak przygotowany preparat podlegał skanowaniu wstępnemu z prędkością 10 mm/s. Po zmierzeniu długości kości piszczelowej wyznaczano miejsce pomiarowe, w którym przeprowadzone było skanowanie pomiarowe. Ustawienia oprogramowania komputera, sterującego pracą pQCT zawarte zostały w Tabeli 3.

Uzyskane wyniki pomiarowe stanowiły podstawę do dalszych obliczeń, pozwalających na określenie powierzchni przekroju poprzecznego mięśni (mCSA),

gęstości mięśni (MD), powierzchni tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej (IMAT) oraz tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT). Obliczenia te przeprowadzone zostały w oparciu o poniższe wzory.

Tabela 3. Najważniejsze ustawienia kalibracyjne obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT), pozwalające na pomiary tkanki mięśniowej w zakresie powierzchni przekroju poprzecznego mięśni, gęstości mięśni, powierzchni tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej.

Krok analizy	**Obszar badany**	**Wartość progowa skanu**	**Tryb separacji tkanki kostnej i tkanek miękkich**	**Tryb separacji tkanki kostnej zbitej**	**Wartość progowa dla tkanki kostnej zbitej**	**Filtry**
1	Cały obszar	-100	3	2	149	F03F05F05
2	Cały obszar	40	31	2	710	F03F05F05
3	Cały obszar	-100	3	2	710	
4	Cały obszar	40	1	2	-100	U01U01U01 U04

Powierzchnia mięśni (mCSA)

(#2 CRTSUB_A – #2 CRT_A + (#2 TRAB_A – (#3 CRT_A – #2 CRT_A)))

*0.01cm^2/mm^2 = Muscle CSA (cm^2)

gdzie:

#2 CRTSUB_A - powierzchnia tkanki zbitej-subzbitej z 2 kroku analizy

#2 CRT_A - powierzchnia zbitej z 2 kroku analizy

#2 TRAB_A - powierzchnia tkanki gąbczastej z 2 kroku analizy

#3 CRT_A - powierzchnia zbitej z 3 kroku analizy

Gęstość mięśni (MD)

((#2 CRTSUB_DEN * (#2 CRTSUB_A / #1 CRT_A)) – #1 CRT_DEN) / ((#2 CRTSUB_A – #1 CRT_A) / #1 CRT_A) = Muscle Density (mg/cm^3)

gdzie:

#2 CRTSUB_DEN - gęstość tkanki zbitej-subzbitej z 2 kroku analizy

#2 CRTSUB_A - powierzchnia tkanki zbitej-subzbitej z 2 kroku analizy

#1 CRT_A - powierzchnia zbitej z 1 kroku analizy

#1 CRT_DEN - gęstość tkanki zbitej z 1 kroku analizy

Powierzchnia tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej (IMAT)

(#3 TRAB_A – #1 TRAB_A + #4 CRT_A)*0.01cm^2/mm^2 = IMAT Area (cm^2)

gdzie:

#3 TRAB_A - powierzchnia tkanki gąbczastej z 3 kroku analizy

#1 TRAB_A - powierzchnia tkanki gąbczastej z 1 kroku analizy

#4 CRT_A - powierzchnia zbitej z 4 kroku analizy

Powierzchnia tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT)

(#1 TRAB_A - #2 TRAB_A - #4 CRT_A – (#2 TRAB_A – (#3 CRT_A - #2 CRT_A)))

*0.01cm^2/mm^2 = SAT (cm^2)

gdzie:

#1 TRAB_A – powierzchnia skóry, tkanki tłuszczowej podskórnej oraz szpiku kostnego (mm^2)

#2 TRAB_A - powierzchnia jamy szpikowej (mm^2)

#4 CRT_A – powierzchnia skóry (mm^2)

#3 CRT_A - powierzchnia tkanki kostnej i powierzchnia jamy szpikowej (mm^2)

#2 CRT_A – powierzchnia tkanki kostnej (mm^2)

3.7. Analizy biochemicznych wskaźników metabolizmu tkanki kostnej

Ocena wskaźników metabolicznych tkanki kostnej obejmowała pomiar stężenia w surowicy krwi C-końcowego telopeptydu kolagenu typu I (CTX-I) (nr kat. AC-06F1 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, UK), osteokalcyny (OC) (nr kat. AC-12F1 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, Wielka Brytania), a także specyficznej dla kości fosfatazy zasadowej (nr kat. E-EL-R1109 – Immunodiagnostic Systems, Bolton, Wielka Brytania). Analizy przeprowadzono za pomocą ww. komercyjnych testów immunoenzymatycznych (ELISA) oraz czytnika do mikropłytek Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, LA, USA).

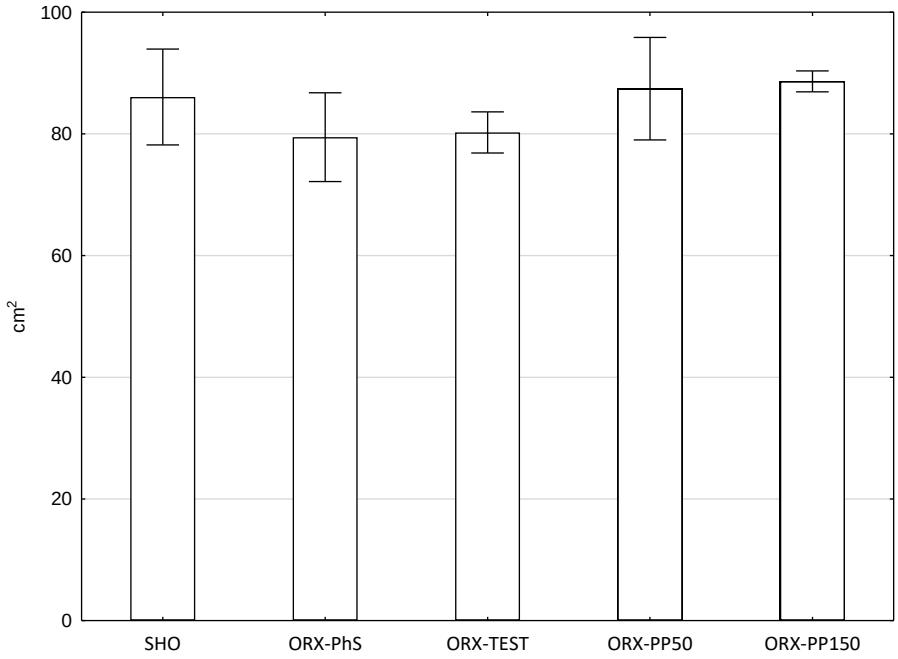
3.8. Analiza statystyczna

Wartości analizowanych parametrów przedstawiono jako wartości średnie wraz z błędem standardowym średniej ($x \pm SE$). Normalność rozkładu danych zweryfikowano stosując test Shapiro-Wilka. Porównania wielowymiarowe przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA). Po stwierdzeniu istotnych różnic statystycznych między poszczególnymi grupami, w celu ich dokładniejszego zbadania przeprowadzono testy post hoc Tukeya. Określono również macierze korelacji parametrów wytrzymałościowych w oparciu o analizę korelacji z bloku statystyk podstawowych. Za współczynnik istotności statystycznej przyjęto $P < 0,05$. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu komputerowego Statistica 13.3 PL (Tibco, Palo Alto, CA, USA).

4. WYNIKI

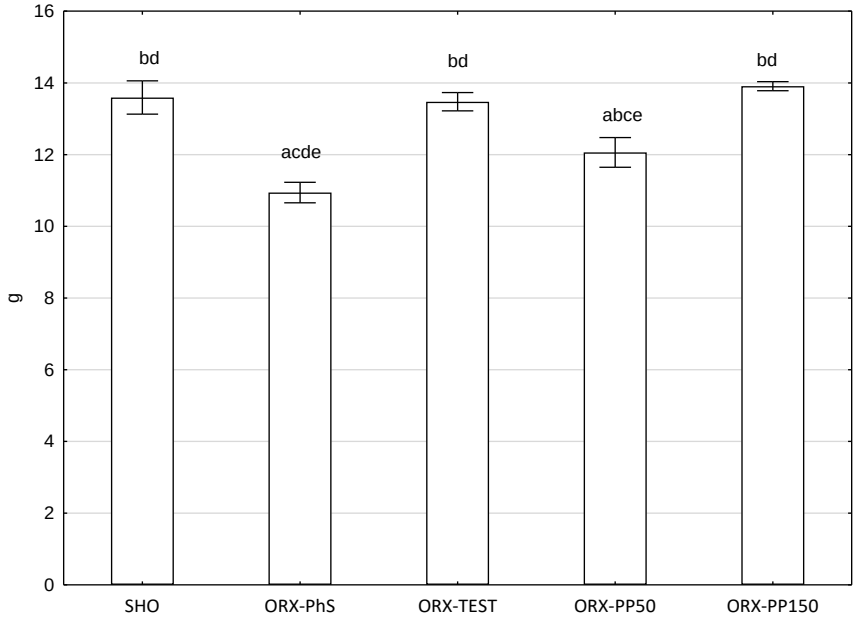
4.1. Analiza densytometryczna (DXA) całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych

Rycina 2. Powierzchnia tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.Ar) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA



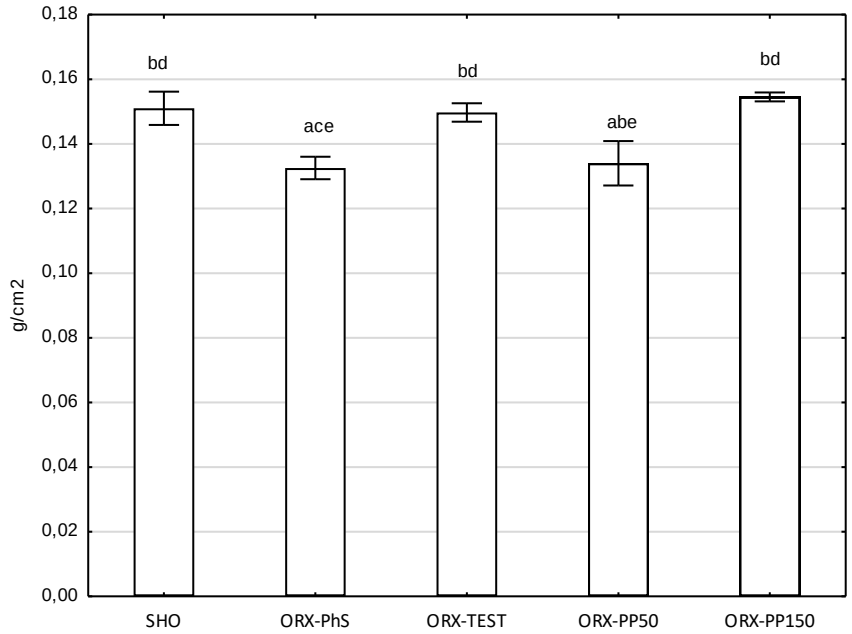
Analiza densytometryczna nie wykazała istotnego wpływu orchidektomii, testosteronu, a także różnych dawek pyłku sosnowego na powierzchnię całkowitą szkieletu szczurów (Ts.Ar). Odnotować należy wyłącznie tendencję do niższych wartości Ts.Ar (*vs.* SHO) w grupach ORX-PhS (8%) oraz ORX-TEST (7%).

Rycina 3. Zawartość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA



Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Rycina 4. Gęstość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu (Ts.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA

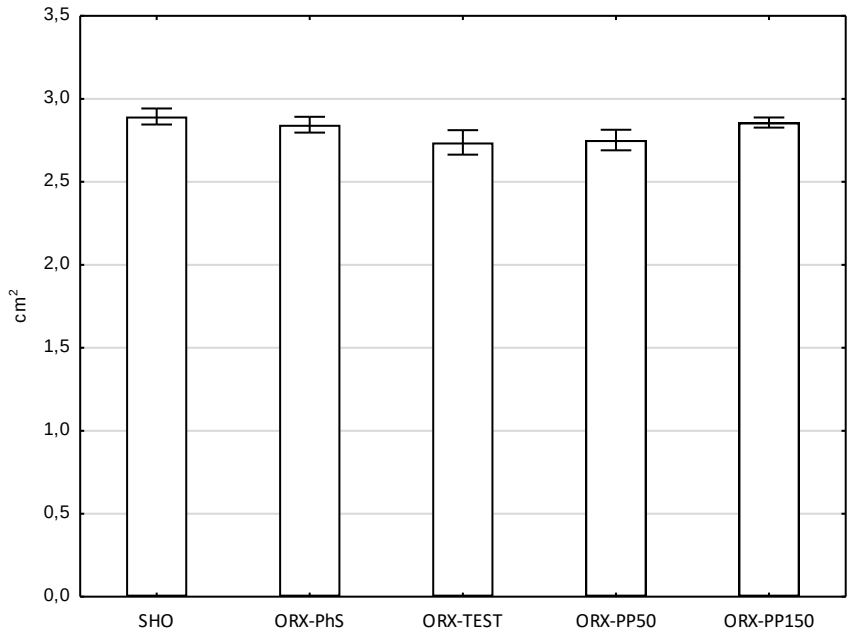


Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

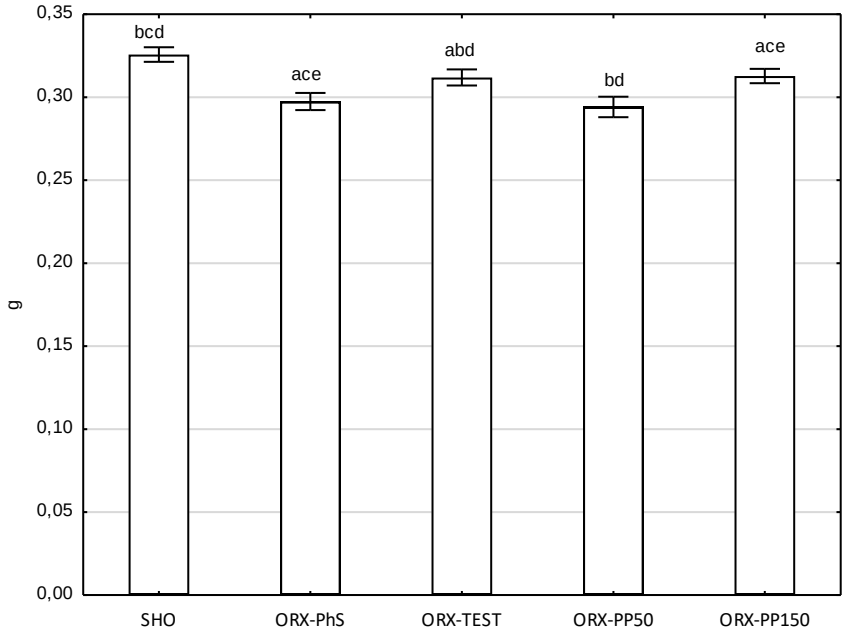
Najniższą zawartością mineralną (Ts.BMC) cechował się szkielet gonadektomizowanych szczurów otrzymujących płyn fizjologiczny (ORX-PhS), co zostało statystycznie potwierdzone względem pozostałych grup doświadczenia

(P < 0,01). Istotnie niższe Ts.BMC wykazywał również kościec samców w grupie ORX PP50 w odniesieniu do grup SHO, ORX-TEST oraz ORX-PP150 (P < 0,01). Stosowanie testosteronu oraz większej dawki pyłku sosnowego nie zmieniło całkowitej zawartości mineralnej szkieletów szczurów w tych grupach, a uzyskane wartości Ts.BMC, były zbliżone do tych w kontrolnej grupie SHO. Również gęstość mineralna całego szkieletu (Ts.BMD) cechowała się najniższymi wartościami w grupach ORX-PhS oraz ORX-PP50, co zostało statystycznie potwierdzone w odniesieniu do operowanej rzekomo grupy kontrolnej (P < 0,01). Ts.BMD w grupie ORX-PP50 była również istotnie niższa względem wartości uzyskanych w grupie samców ORX-PP150 (P = 0,0007). Stosowanie testosteronu oraz większej dawki pyłku sosnowego utrzymało wartości Ts.BMD na poziomie jak w grupie SHO.

Rycina 5. Powierzchnia izolowanych kości piszczelowych (t.Ar) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA

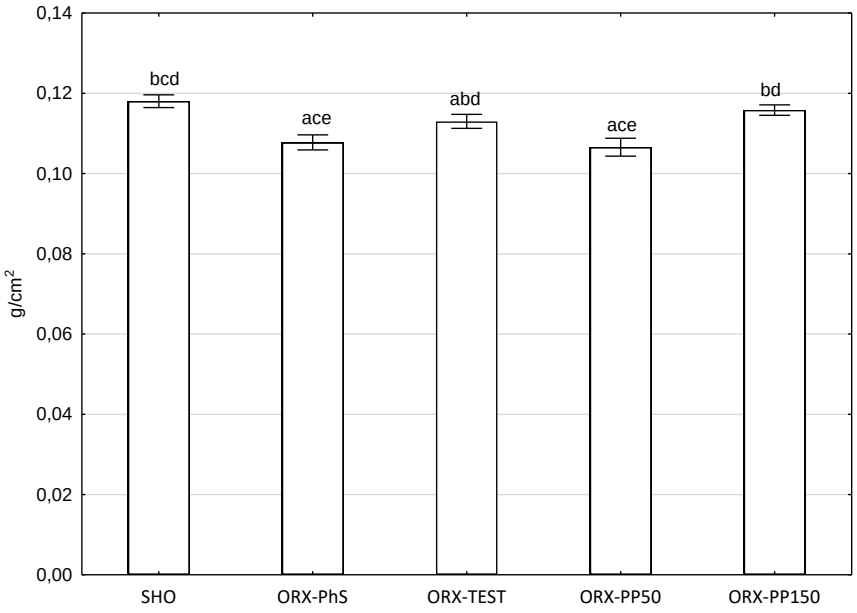


Rycina 6. Zawartość mineralna kości piszczelowych (t.BMC) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA



Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Rycina 7. Gęstość mineralna kości piszczelowych (t.BMD) szczurów grup kontrolnych i doświadczalnych określona metodą DXA



Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Podobnie jak w przypadku całego szkieletu gonadektomia oraz stosowane substancje pozostały bez istotnego wpływu na powierzchnię kości piszczelowych (t.Ar).

Stwierdzono natomiast istotne zmniejszanie zawartości (t.BMC) oraz gęstości mineralnej (t.BMD) kości piszczelowych w orchidektomizowanej grupie kontrolnej (ORX-PhS) oraz otrzymującej pyłek sosnowy w dawce 50 mg/kg m.c. w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczenia ($P < 0,05$). Również i w tym wypadku w grupach stosowania testosteronu oraz pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. wartości t.BMC oraz t.BMD były zbliżone do tych w grupie SHO.

4.2. Tomograficzna analiza tkanki kostnej zbitej w połowie długości kości piszczelowych.

Wyniki opisujące tomograficzną analizę przekroju trzonu oraz tkanki zbitej przeprowadzone w 50% długości kości piszczelowych zawarte zostały w Tabeli 4. Orchidektomia szczurów statystycznie istotnie zmniejszyła zawartość mineralną (Tot.BMC) ($P=0,003$) oraz wolumetryczną gęstość mineralną (Tot.vBMD) ($P = 0,005$) określonych dla całkowitego przekroju kości w porównaniu z grupą kontrolną SHO. Niższe wartości Tot.BMC oraz Tot.vBMD stwierdzone zostały również w grupie doświadczalnych samców otrzymujących pyłek sosnowy w dawce 50 mg/kg m.c. ($P < 0,05$ *vs.* SHO). Podawanie pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. spowodowało utrzymanie wartości Tot.BMC i Tot.vBMD na poziomie operowanej rzekomo grupy kontrolnej (SHO) oraz otrzymującej testosteron (ORX-TEST). Podobna zależność zmian dotyczyła tomograficznej analizy wyłącznie tkanki kostnej zbitej. Istotnie najniższe wartości Ct.BMC oraz Ct.vBMD stwierdzone zostały w grupach ORX-PhS oraz ORX-PP50 ($P < 0,05$). Wyższa dawka pyłku sosnowego zahamowała zmiany zanikowe tkanki kostnej zbitej i pozwoliła na utrzymanie wartości ocenianych parametrów na poziomie jak w grupach kontrolnych SHO oraz ORX-TEST.

Tabela 4. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju trzonu kości oraz tkanki kostnej zbitej określone w połowie (50%) długości kości piszczelowych.

	SHO	**ORX-PhS**	**ORX-TEST**	**ORX-PP50**	**ORX-PP150**
Tot. BMC – (mg/mm)	6,41 ± 0,07 bd	5,97 ± 0,03 ace	6,29 ± 0,04 bd	5,82 ± 0,1 ace	6,35 ± 0,08 bd
Tot. vBMD (mg/mm3)	1054,9 ± 12,03 bd	996,51 ± 19,9 ace	1047,74 ± 14,75 bd	1009,88 ± 11,95 ace	1071,85 ± 5,59 bd
Tot.Ar (mm2)	6,12 ± 0,12	5,96 ± 0,08	5,91 ± 0,09	6,06 ± 0,05	6,17 ± 0,14
Ct. BMC (mg/mm)	5,95 ± 0,11 bd	5,42 ± 0,07 ace	5,82 ± 0,1 bd	5,56 ± 0,07 ace	5,92 ±0,06 bd
Ct.vBMD (mg/mm3)	1373,46 ± 13,43 b	1329,04 ± 14,72 ace	1372,23 ± 9,15 b	1359,38 ± 12,40 e	1393,74 ± 5,13 bd
Ct. Ar (mm2)	4,78 ± 0,18	4,38 ± 0,20	4,64 ± 0,15	4,30 ± 0,19	4,71 ± 0,17
Ct. Th (mm)	0,723 ± 0,022 bde	0,643 ± 0,008 ace	0,688 ± 0,009 bd	0,619 ± 0,009 ace	0,685 ± 0,011 abd
Peri.C (mm)	8,83 ± 0,08	8,73 ± 0,15	8,72 ± 0,15	8,64 ± 0,09	8,87 ± 0,13
Endo.C (mm)	4,22 ± 0,16 bd	4,56 ± 0,07 ace	4,22 ± 0,08 bd	4,54 ± 0,08 ac	4,27 ± 0,04 b

Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150. Tot. BMC - całkowita zawartość mineralna kości; Tot.vBMD – całkowita wolumetryczna gęstość mineralna kości; Tot.Ar – całkowita powierzchnia kości; Ct.BMC – zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej; Ct.vBMD – wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitej; Ct.Ar – powierzchnia tkanki kostnej zbitej; Ct.Th – grubość tkanki kostnej zbitej; Peri.C - obwód zewnętrzny kości; Endo.C - obwód wewnętrzny kości.

Zarówno gonadektomia, jak i stosowane substancje nie wpłynęły istotnie na powierzchnię całkowitą przekroju kości (Tot.Ar), której wartości w poszczególnych grupach kształtowały się na zbliżonym poziomie. Eliminacja wpływu hormonów gonadalnych zmniejszyła powierzchnię tkanki kostnej zbitej (Ct.Ar) o 8% (grupa

ORX-PhS), natomiast w grupie ORX-PP50, Ct.Ar była niższa o 10% w porównaniu do kontrolnej grupy SHO. Zauważyć należy, że różnice wartości średnich nie znalazły jednak statystycznego potwierdzenia. Nie wykazano również istotnych różnic w wielkości obwodu zewnętrznego (PERI.C) trzonu badanych kości piszczelowych. Natomiast w obwód wewnątrzkostny (ENDO.C) był istotnie większy w grupach ORX-PhS oraz ORX-PP50 w porównaniu z grupami SHO, ORX-TEST oraz ORX-PP150 ($P < 0,05$). Konsekwencją zmian obserwowanych w wielkościach obwodów zewnętrznego i wewnętrznego były zamiany grubości warstwy tkanki kostnej zbitej (Ct.Th). Istotnie najniższe wartość Ct.Th stwierdzone zostały w grupie samców ORX otrzymujących PhS oraz pyłek sosnowy w dawce 50 mg/kg ($P < 0,05$). Grubość warstwy tkanki kostnej zbitej w grupach SHO, ORX-TEST oraz ORX-PP150 nie wykazywały istotnych różnic wartości między sobą.

4.3. Analiza tkanki kostnej gąbczastej w bliższej części przynasadowej kości piszczelowej z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego.

Wyniki opisujące tomograficzną analizę kości piszczelowych w bliższej części przynasadowej przedstawione zostały w Tabeli 5. Pomiary całkowitego przekroju poprzecznego bliższej części przynasadowej kości piszczelowych wykazały istotne zmniejszenie Tot.BMC w grupach ORX-PhS ($P < 0,0001$) oraz ORX-PP50 ($P = 0,0005$) względem kontrolnej grupy operowanej rzekomo (SHO). Istotnie niższym Tot.BMC (*vs.* SHO) cechował się również przekrój całkowity bliższej części przynasadowej kości piszczelowych orchidektomizowanych samców otrzymujących testosteron (grupa ORX-TEST) ($P = 0,03$). Natomiast stosowanie pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg efektywnie utrzymało zawartość mineralną całkowitego przekroju

badanej kości na poziomie jak w grupie SHO. Ocena wolumetrycznej gęstości mineralnej (Tot.vBMD) bliższej części przynasadowej kości piszczelowych wykazała podobną zależność zmian, z tą różnicą, że Tot.vBMD kości piszczelowych samców otrzymujących testosteron (grupa ORX-TEST) mimo, że była niższa o ponad 6% względem grupy SHO, to nie wykazywała statystycznie istotnych różnic wartości średnich. Odrębna ocena tomograficzna tkanki kostnej gąbczastej dowodzi znaczącego wpływu gonadektomii samców na zawartość (Tb.BMC) i gęstość mineralną (Tb.vBMD). Eliminacja hormonalnego oddziaływania gonad (grupa ORX-PhS) zmniejszyła Tb.BMC o 42% ($P < 0,00001$) i Tb.vBMD o 31% ($P < 0,0001$) w porównaniu z grupą SHO. Istotnie niższe wartości tych parametrów zanotowano również w grupie ORX-PP50, a różnice wynosiły odpowiednio 30% ($P = 0,0009$) oraz 21% ($P = 0,0002$) (*vs.* SHO). Na uwagę zasługuje jednak wpływ pyłku sosnowego podawanego w dawce 50 mg/kg m.c. na tkankę kostną gąbczastą. Wartości uzyskane w tej grupie były wyższe względem kontrolnej grupy ORX-PhS odpowiednio o 20% i 14%, a istotności różnic wartości średnich zostały potwierdzone statystycznie ($P < 0,05$). Mimo podawania testosteronu i pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. również odnotowano zmniejszenie wartości Tb.BMC oraz Tb.vBMD bliższej części przynasadowej kości piszczelowych, przy braku statystycznego potwierdzenia różnic wartości średnich.

Tabela 5. Analiza tomograficzna całkowitego przekroju oraz tkanki kostnej gąbczastej bliższej części przynasadowej kości piszczelowych szczurów.

	SHO	**ORX-PhS**	**ORX-TEST**	**ORX-PP50**	**ORX-PP150**

Tot. BMC – (mg/mm)	11,96 ±0,4 bcd	10,08 ±0,18 ace	11,21 ± 0,16 bd	10,7 ± 0,17 Ae	11,7 ± 0,14 bd
Tot. vBMD (mg/mm3)	613,15 ± 14,99 bd	549,51 ± 8,96 ace	588,89 ± 9,71 bd	554,08 ± 11,11 ace	603,06 ± 4,84 bd
Tot.Ar (mm2)	19,51 ± 0,47 bd	15,70 ± 0,44 ace	18,23 ± 0,72 bd	16,98 ±0,43 Ae	19,96 ± 0,22 bcd
Tb. BMC (mg.mm)	2,32 ± 0,16 bd	1,35 ± 0,02 aced	2,03 ± 0,16 bd	1,61 ± 0,02 Abce	2,16 ± 0,11 bd
Tb.vBMD (mg.mm3)	264,63 ± 18,56 bd	182,24 ± 4,98 aced	236,79 ± 12,49 b	207,68 ± 2,01 Ab	232,93 ± 3,70 b
Tb.Ar (mm3)	8,78 ± 0,21 bd	7,33 ± 0,21 acde	8,62 ±0,28 b	8,12 ± 0,15 Abe	8,98 ± 0,10 bd

Oznaczenia: a vs. SHO; b vs. ORX-PhS; c vs. ORX-TEST; d vs. ORX-PP50; e vs. ORX-PP150. Tot.BMC - całkowita zawartość mineralna kości; Tot.vBMD – całkowita wolumetryczna gęstość mineralna kości; Tot.Ar całkowita powierzchnia kości; Tb.BMC – zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej; Tb.vBMD – wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej gąbczastej; Tb.Ar – powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej.

4.4. Tomograficzna analiza tkanki mięśniowej.

Wyniki opisujące tomograficzną analizę mięśni przeprowadzoną w 50% długości podudzia zawarte zostały w Tabeli 6. Orchidektomia szczurów statystycznie istotnie zmniejszyła powierzchnię (mCSA) ($P < 0.00001$) oraz gęstość mięśni (MD) ($P < 0.00001$). Również stosowanie niższej dawki pyłku sosnowego statystycznie istotnie zmniejszyło mCSA ($P = 0,0004$) oraz MD ($P < 0.00001$) względem grupy SHO, a uzyskane wartości tych parametrów nie odbiegały od zanotowanych w grupie ORX-PhS.

Tabela 6. Analiza tomograficzna przekroju mięśni przeprowadzona w 50 % długości podudzia samców szczurów.

	SHO	**ORX-PhS**	**ORX-TEST**	**ORX-PP50**	**ORX-PP150**
mCSA (cm^2)	1,97±0,03 b	1,73±0,01 ace	1,88±0,03 b	1,79±0,02 Ae	1,90±0,02 bd
MD (mg/cm^3)	84,40±0,15 bd	82,43±0,17 ace	83,76±0,14 bde	82,50±0,21 ace	84,29±0,24 bcd
IMAT (cm^2)	0,384±0,008 bde	0,442±0,004 ace	0,406±0,007 b	0,429±0,003 a	0,411±0,003 ab
SAT (cm^2)	0,058±0,003 bcde	0,087±0,004 acde	0,071±0,003 ab	0,077±0,002 abe	0,066±0,002 abd

Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150. mCSA – pole powierzchni przekroju mięśni; MD – Gęstość mięśni; IMAT – powierzchnia tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej; SAT – powierzchnia tkanki tłuszczowej podskórnej.

Podawanie testosteronu oraz wyższej dawki pyłku sosnowego zahamowało zmiany zanikowe mięśni, czego wyrazem były zbliżone wartości mCSA oraz MD, do tych w grupie SHO. Orchidektomia statystycznie istotnie zwiększyła powierzchnię tkanki tłuszczowej w przekroju mięśnia (IMAT), co zostało statystycznie potwierdzone w grupie ORX-PhS ($P = 0,0003$). Również niższa dawka pyłku sosnowego nie ograniczyła, warunkowanej przez orchidektomię, kumulacji tkanki tłuszczowej w mięśniach, a jej powierzchnia była o blisko 12% większa niż w grupie SHO ($P = 0,0008$). Także stosowanie testosteronu oraz większej dawki PP zaznaczyło się nieznacznym, nie potwierdzonym statystycznie wzrostem IMAT w porównaniu z grupą SHO. Orchidektomia aż o 85% zwiększyła powierzchnię tkanki tłuszczowej podskórnej w grupie ORX-PhS ($P > 0,00001$). Również w pozostałych grupach szczurów podlegających orchidektomii, powierzchnia tkanki tłuszczowej była statystycznie istotnie większa w porównaniu z kontrolna grupą SHO ($P < 0,05$).

4.5. Analiza właściwości strukturalnych tkanki kostnej gąbczastej bliższej części przynasadowej kości piszczelowych z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej (μ-CT)

Wyniki mikrotomograficznej analizy parametrów histomorfometrycznych zawarte zostały w Tabeli 7. Stwierdzono, że orchidektomia statystycznie istotnie zmniejszyła wskaźnik procentowej zawartości objętościowej tkanki kostnej gąbczastej (BV/TV – bone volume/total volume), którego najniższe wartości stwierdzone zostały w grupie ORX-PhS ($P < 0,0001$). Istotne zmniejszenie wartości tego wskaźnika odnotowano również w grupie stosowania pyłku sosnowego w dawce 50 mg/kg m.c. ($P = 0,001$). Wspomnieć należy jednak, że wartości odnotowane w grupie ORX-50 były o 12% ($P = 0,06$) wyższe w porównaniu z grupą ORX-PhS. Natomiast w następstwie stosowania testosteronu oraz pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. odnotowano tendencję do niższych wartości BV/TV względem grupy ORX-PhS. Wyznaczono również indeks określający zawartość powierzchni zajmowanej przez tkankę kostną gąbczastą w odniesieniu do jej objętości (BS/BV – bone surface/bone volume). Parametr ten nazywany jest również gęstością powierzchni. Analiza z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej wykazała istotny wpływ orchidektomii na BS/BV, który w grupie ORX-PhS manifestował się znamiennie najniższymi wartościami spośród wszystkich grup doświadczenia ($P = 0,0002$ *vs.* SHO). Istotnie niższymi wartościami BS/BV cechowała się również grupa ORX-PP50 ($P = 0,007$; *vs.* SHO). BS/BV oceniana w bliższej części przynasadowej kości piszczelowej orchidektomizowanych samców w grupach otrzymujących testosteron oraz pyłek sosnowy w dawce 150 mg/kg m.c. nie wykazywały istotnych różnic wartości w porównaniu z grupą kontrolną SHO.

Tabela 7. Mikrotomograficzna analiza parametrów strukturalnych tkanki kostnej gąbczastej bliższej części przynasadowej kości piszczelowych.

	SHO	**ORX-PhS**	**ORX-TEST**	**ORX-PP50**	**ORX-PP150**
TV **(cm^3)**	106,37±2,18 b	91,08±1,41 Ace	102,28±2,10 bde	93,71±1,45 acd	107,50±1,43 bcd
BV **(cm^3)**	27,06±1,11 bcd	15,99±0,37 Acde	24,60±0,37 abd	18,41±0,54 abce	25,45±0,49 bd
BS **(cm^2)**	453,92±9,95 bcde	546,28± 13,15 Ace	495,78±11,58 abd	562,40±5,18 ace	487,80±6,81 abd
BS/TV **(%)**	25,54±1,25 bd	17,59±0,50 Ace	24,12±0,62 bd	19,67±0,61 ace	23,71±0,58 bd
BS/BV **(1/mm)**	25,68±1,15 bd	20,76±0,83 Ace	25,38±0,70 bd	22,29±0,58 ac	24,13±0,82 b
Tb.Th **(mm)**	0,191±0,027 bd	0,113±0,003 Aced	0,171±0,012 bd	0,139±0,006 abce	0,173±0,010 bd
Tb.N **(1/mm)**	1,99±0,07 bd	1,57±0,03 Acde	1,90±0,022 bd	1,76±0,023 abce	1,97±0,03 bd
Tb.Sp **(mm)**	0,266±0,027 bd	0,432±0,009 Acde	0,301±0,012 bd	0,371±0,019 abce	0,298±0,010 bd

Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150. TV – całkowita objętość badanej próbki; BV – objętość tkanki kostnej; BS – powierzchnia tkanki kostnej; BS/TV – wskaźnik procentowej zawartości objętościowej tkanki kostnej; BS/BV – indeks określający zawartość powierzchni zajmowanej przez tkankę kostną do jej objętości; Tb.Th – grubość beleczek kostnych; Tb.Sp – średnia wielkość przestrzeni wolnych pomiędzy beleczkami; Tb.N – liczba beleczek kostnych przekroju kości.

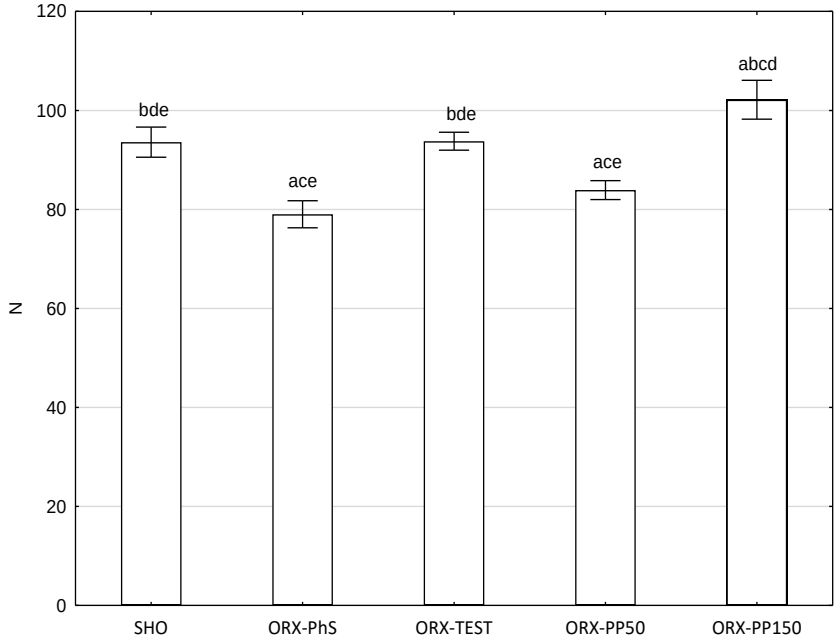
Najmniejszą grubością beleczek kostnych (Tb.Th) (-38% *vs.* SHO) cechowała się tkanka kostna gąbczasta bliższej części przynasadowej kości piszczelowych samców

ORX-PhS (P < 00001). Istotnie niższe Tb.Th, w porównaniu do pozostałych grup doświadczenia, odnotowano również u samców ORX-PP50 (P <0,05), przy czym wartości w tej grupie były istotnie wyższe względem orchidektomizowanej grupy kontrolnej (ORX-PhS) (P = 0,05). Grubość beleczek w grupach ORX-TEST oraz ORX-PP150 była względem siebie zbliżona i nieistotnie niższa względem wartości zanotowanych w kościach piszczelowych samców operowanych rzekomo (SHO). Podobna charakterystyka zmian dotyczyła średniej liczby beleczek kostnych przekroju kości (Tb.N). Mikrotomograficzna ocena średniej wielkości przestrzeni wolnych pomiędzy beleczkami (Tb.Sp) wykazała statystycznie największą jej wartość w grupie ORX-PhS (41%) oraz w grupie ORX-PP50 (39%) (P < 0,001; *vs.* SHO). Wielkość Tb.Sp w grupach ORX-TEST oraz ORX-PP150 cechowała wyłącznie tendencja do wyższych wartości w porównaniu do grupy SHO.

4.6. Ocena wytrzymałości mechanicznej kości piszczelowych przeprowadzona z wykorzystaniem trójpunktowego testu ugięcia.

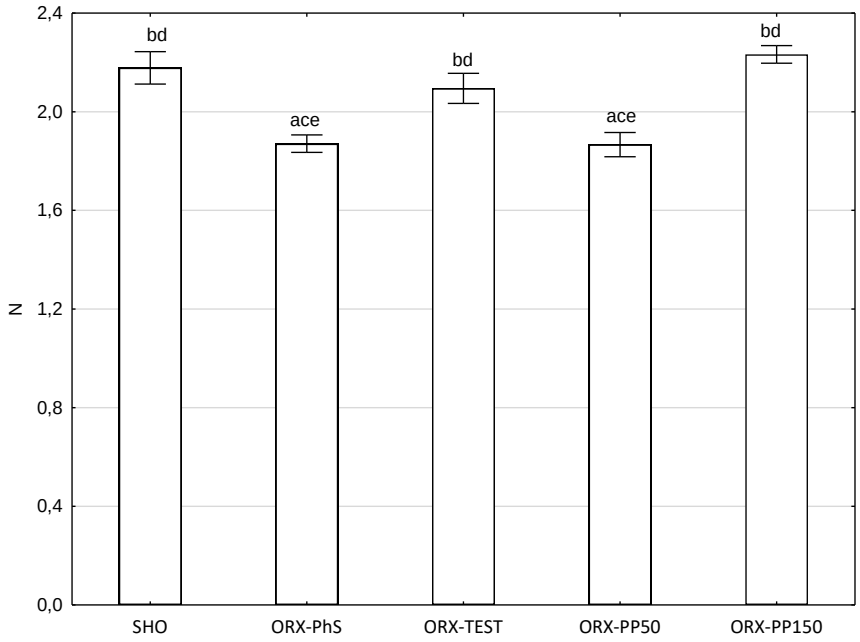
Eliminacja wpływu sterydowych hormonów płciowych pochodzenia gonadalnego znacząco zmniejszyła wytrzymałość mechaniczną kości piszczelowych, czego wyrazem były statystycznie istotnie niższe wartości siły maksymalnej (F_{max}) (Rycina 7), granicy sprężystości (F_r) (Rycina 8) oraz modułu elastyczności Younga (E_{mod}) (Rycina 9) w grupie kontrolnej ORX–PhS oraz otrzymującej pyłek sosnowy w dawce 50 mg/kg m.c., w porównaniu z pozostałymi grupami doświadczenia (P < 0,05). Stosowanie testosteronu oraz pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. utrzymało wartości przyjętych parametrów wytrzymałościowych na poziomie jak w grupie SHO.

Rycina 7. Maksymalna siła łamiąca (F_{max}) kości piszczelowe zmierzona w trójpunktowym teście ugięcia



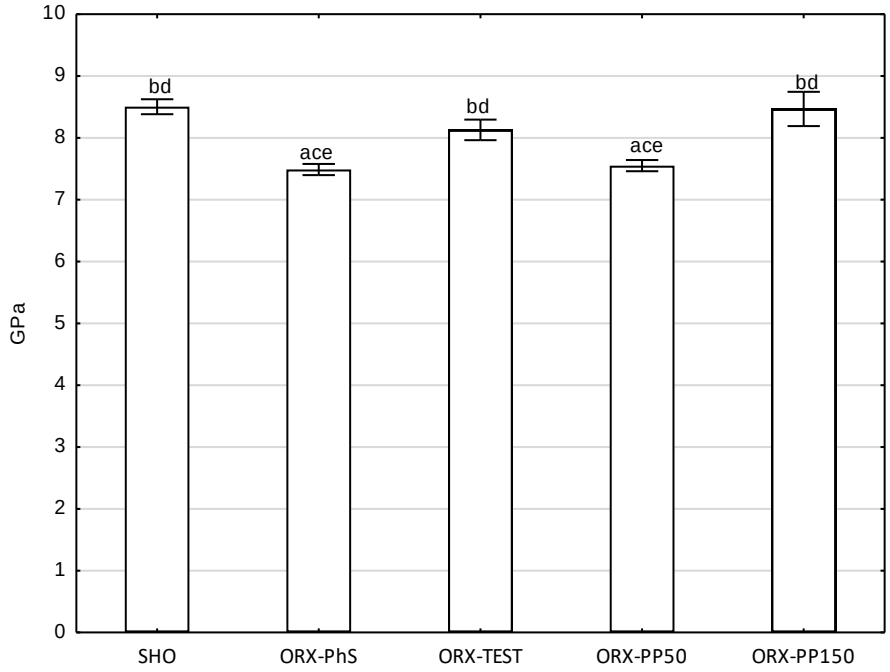
Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Rycina 8. Granica sprężystości (F_r) kości piszczelowych zmierzona w trójpunktowym teście ugięcia



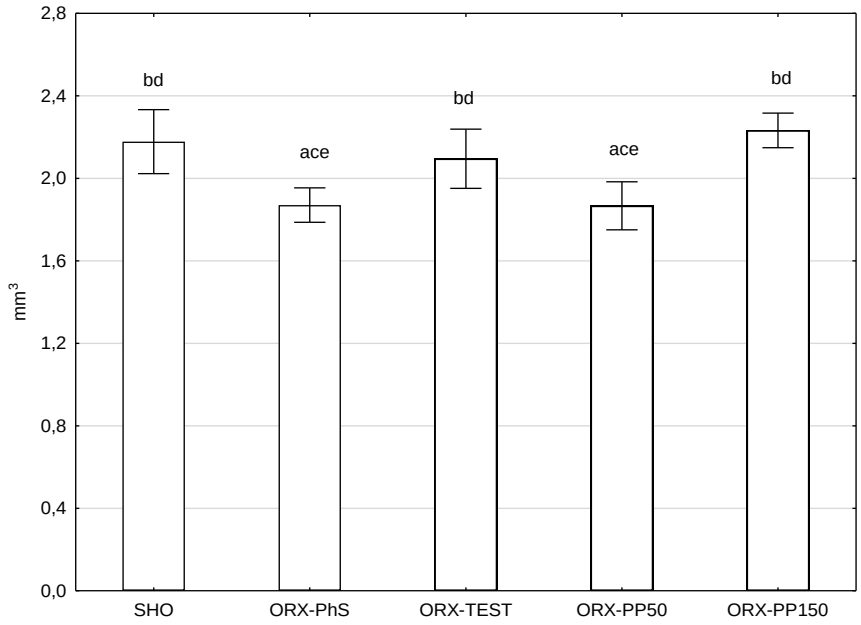
Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Rycina 9. Modułu elastyczności Young'a kości piszczelowych zmierzony w trójpunktowym teście ugięcia



Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Rycina 10. Osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI) kości piszczelowych wyznaczony w badaniu pQCT



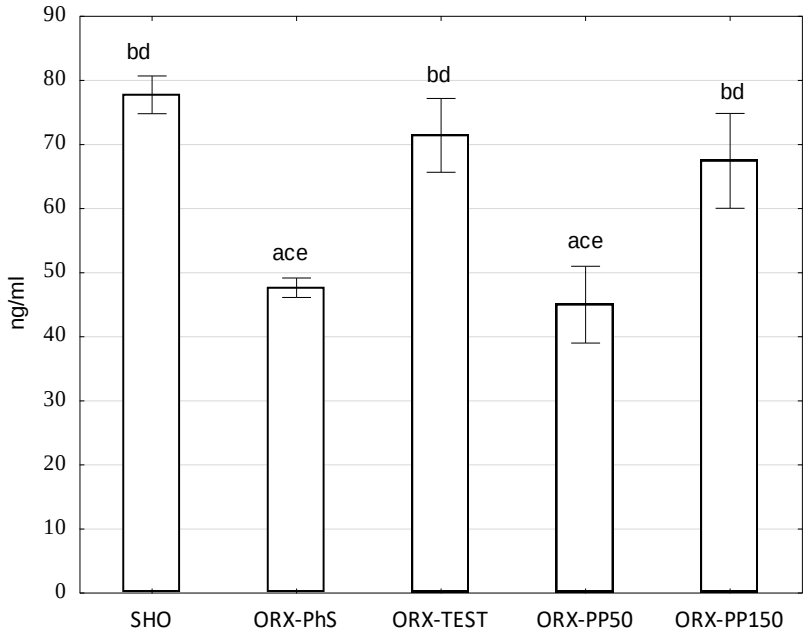
Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Co ciekawe, siłę maksymalną (F_{max}) kości piszczelowych samców w grupie ORX-PP150 cechowały statystycznie istotnie wyższe wartości w odniesieniu do kontrolnej grupy SHO oraz grupy ORX-TEST ($P < 0,04$).

Podobna zależność zmian, jaką stwierdzono podczas pomiarów parametrów wytrzymałościowych z wykorzystaniem maszyny obciążeniowej, odnotowana została w badaniu z wykorzystaniem pQCT, w którym określony został osiowy wskaźnik siła-odkształcenie (xSSI), pozwalający na przewidywanie wytrzymałości mechanicznej (Rycina 10). Również i w tej analizie najniższe wartości stwierdzone zostały w grupach samców ORX-PhS oraz ORX-PP50 ($P < 0,05$), natomiast wielkości wskaźnika xSSI kości piszczelowych samców w grupach SHO, ORX-TEST oraz ORX-PP150 kształtowały się na podobnym względem siebie poziomie.

4.7. Ocena biochemicznych wskaźników metabolizmu kostnego.

Rycina 11. Stężenie osteokalcyny (OC) w osoczu krwi samców grup kontrolnych i doświadczalnych.

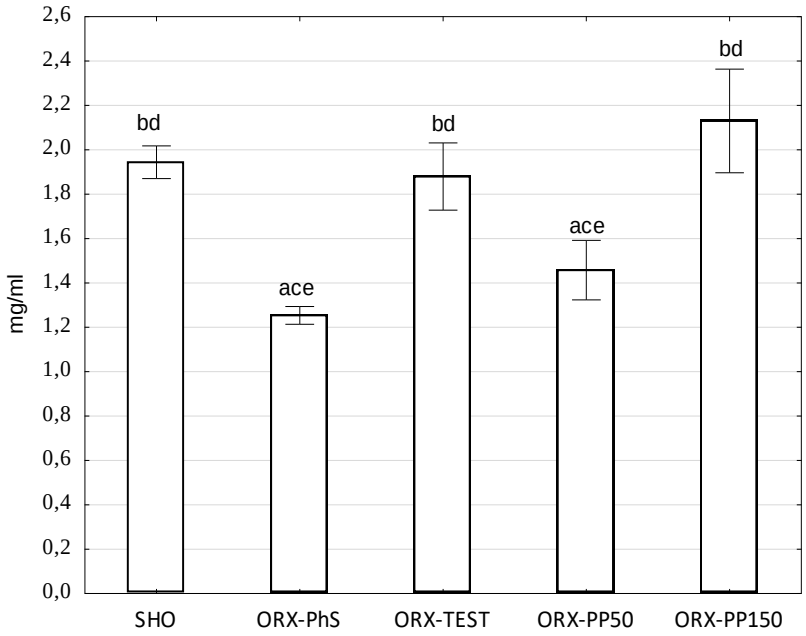


Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Osteokalcyna (OC), będąca niekolagenowym białkiem tkanki kostnej, stanowi czuły marker aktywności metabolicznej osteoblastów i obrotu kostnego. Uzyskane wyniki wskazują na istotny spadek jej stężenia we krwi szczurów w grupach ORX-PhS oraz ORX-PP50 ($P < 0,05$). W grupach SHO, ORX-PP150 i ORX-TEST wartości stężeń OC były względem siebie zbliżone (Rycina 11).

Podobna do OC zależność zmian dotyczyła stężenia frakcji kostnej fosfatazy zasadowej (bALP). Zauważyć jednak należy, że stężenie bALP w grupie ORX-PP50 było o 16% większe niż w kontrolnej grupie ORX-PhS. Podawanie wyższej dawki pyłku sosnowego skutkowało blisko 10% wzrostem poziomu bALP *vs.* SHO (Rycina 12).

Rycina 12. Stężenie frakcji kostnej fosfatazy zasadowej (bALP) w osoczu krwi.

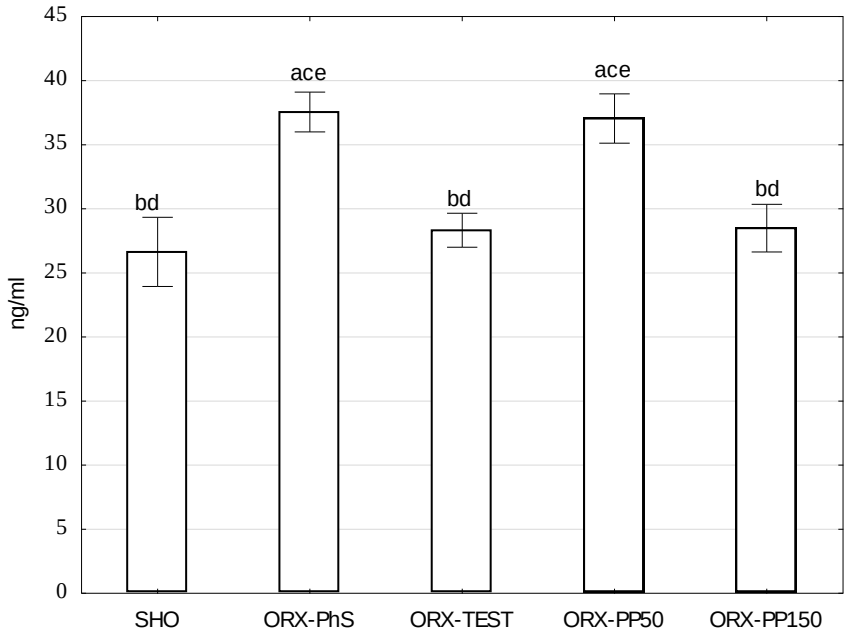


Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

Intensywność osteoklastycznej resorpcji tkanki kostnej oceniana była w oparciu o pomiar stężenia C-końcowego usieciowionego telopeptydu łańcucha kolagenu typu I

(CTX-I) (Rycina 13). Najintensywniejsza resorpcja tkanki kostnej, której miarą było najwyższe stężenie CTX-I w surowicy krwi stwierdzono u szczurów w grupach ORX-PhS oraz ORX-PP50, co zostało statystycznie potwierdzone względem pozostałych grup ($P < 0,05$). W grupach gdzie stosowano testosteron oraz pyłek sosnowy w wyższej dawce, stężenie CTX-I nie odbiegało od poziomu tego wskaźnika zmierzonego w grupie SHO.

Rycina 13. Stężenie C-końcowego usieciowionego telopeptydu łańcucha kolagenu typu I (CTX-I) w osoczu krwi.



Oznaczenia: a *vs.* SHO; b *vs.* ORX-PhS; c *vs.* ORX-TEST; d *vs.* ORX-PP50; e *vs.* ORX-PP150.

5. **DYSKUSJA**

Osteoporoza u mężczyzn to aktualnie jeden z kluczowych problemów medycznych dotyczący tej płci. Tylko w ciągu pierwszych 5 miesięcy 2023 r w bazie danych PubMed ukazało się drukiem ponad 400 artykułów naukowych dotyczących tego ważnego problemu. Mimo różnic w przebiegu osteoporozy u kobiet i mężczyzn, to konsekwencje medyczne są podobne. Zbliżone są również przyjęte procedury

terapeutyczne. Spośród najczęściej stosowanych grup leków w leczeniu osteoporozy na podkreślenie zasługują bisfosfoniany i hormonalna terapia zastępcza z wykorzystaniem testosteronu [211-214]. Stosowane są również leki, które oddziałują na szlaki metaboliczne warunkujące resorpcję tkanki kostnej, jak np. Denosumab, który hamuje działanie RANKL, białka odpowiedzialnego za stymulowanie procesu resorpcji kości [215, 216] lub Romosozumab, będący inhibitorem sklerostyny – białka hamującego tworzenie nowej tkanki kostnej [217, 218]. Stosowanie inhibitorów sklerostyny skutkuje zwiększeniem aktywności osteoblastów i w konsekwencji pobudzeniem formowania tkanki kostnej [219-221]. Istnieją jednak doniesienia dowodzące nieskuteczności inhibitorów sklerostyny w przebiegu otyłości [222]. W leczeniu osteoporozy stosowane są również syntetyczne formy parathormonu odpowiedzialnego za regulację metabolizmu wapnia i fosforu [223, 224]. Podkreślić jednak należy, że konsekwencją przyjmowania przez pacjentów wspomnianych leków antyosteoporotycznych są liczne skutki uboczne ich stosowania [153, 154]. Dodatkowo nie wszystkie leki stosowane w leczeniu osteoporozy u kobiet posiadają odpowiednio udokumentowaną badaniami klinicznymi skuteczność terapeutyczną ich stosowania u mężczyzn, a także zapis rejestracyjny dopuszczający je do stosowania u tej płci. Dlatego też, współcześnie obserwowane jest rosnące zainteresowanie stosowaniem w lecznictwie preparatów pochodzenia naturalnego, jak również ich syntetycznych pochodnych [225, 226]. Należy mieć świadomość, że preparaty naturalnego pochodzenia nie mogą skutecznie zastąpić terapii osteoporozy, szczególnie w jej zaawansowanej formie, ale ich przyjmowanie w początkowym okresie może efektywnie spowolnić rozwój tej choroby [227-229]. Dlatego prezentowane badania podjęte zostały w celu wykazania potencjalnie osteoprotekcyjnej skuteczności różnych dawek pyłku sosnowego, podawanych samcom szczurów w warunkach rozwoju zmian zanikowych

tkanki kostnej warunkowanych obustronną orchidektomią. Wykorzystanie szczurów jako zwierząt modelowych, jest uznanym postępowaniem w tego typu badaniach [230, 231]. Co więcej, zmiany zachodzące w tkance kostnej u szczurów w warunkach doświadczalnej gonadektomii przypominają te, które obserwuje się u kobiet po menopauzie i mężczyzn po andropauzie [168, 232, 233].

Badanie DXA (absorpcjometria rentgenowska o podwójnej energii) jest uznawana za „złoty standard" w pomiarze gęstości mineralnej kości, co umożliwia ocenę zdrowia i aktualnego stanu układu kostnego [234, 235]. Badanie to jest niezwykle precyzyjne, a przy tym korzysta z niskoenergetycznego promieniowania rentgenowskiego, co minimalizuje ekspozycję na nie i jest bezpiecznym dla pacjenta [235]. W badaniach własnych, wykorzystując DXA, ocenie densytometrycznej podlegał cały szkielet szczurów oraz izolowane kości piszczelowe. Eliminacja wpływu sterydowych hormonów płciowych u samców wywiera istotny wpływ na metabolizm tkanki kostnej [233, 236], czego efektem jest istotne zmniejszenie zawartości mineralnej całego szkieletu, a także w izolowanych kościach piszczelowych, co jest zgodne z wynikami innych badań [237, 238]. Stosowanie testosteronu hamuje zmiany zanikowe tkanki kostnej całego kośćca oraz kości piszczelowych, umożliwiając tym samym utrzymanie zawartości mineralnej na poziomie grupy operowanej rzekomo. Nasze obserwacje potwierdzają również badania innych autorów [239, 240]. Osteoprotekcyjne efekty pyłku sosnowego wynikają z zastosowanej dawki. Wydaje się, że dawka 50 mg/kg m.c. jest niewystarczającą, by ograniczyć utratę minerału w całym kośćcu oraz izolowanych kościach piszczelowych, co prowadzi do intensyfikacji zmian zanikowych tkanki kostnej manifestujących się istotnym obniżeniem zawartości i gęstości mineralnej. Natomiast użycie dawki 150 mg/kg m.c. efektywnie hamowało

zmiany zanikowe, czego efektem było utrzymaniem wartość Ts.BMC oraz t.BMC na poziomie kontrolnej grupy operowanej rzekomo. Podobna zależność dotyczyła Ts.BMD oraz t.BMD. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu orchidektomii oraz pyłku sosnowego na powierzchnię całego szkieletu oraz kości piszczelowych. Zauważyć należy, że badanie tkanki kostnej z wykorzystaniem metody DXA ma charakter dwuwymiarowy (2D), a więc Ts.BMD oraz t.BMD określane są w przeliczeniu na jednostkę powierzchni. Pomiar gęstości mineralnej kości, mierzony za pomocą DXA, daje podstawę do oceny ryzyka złamań i diagnozy osteoporozy [241, 242]. Jednak o jakości tkanki kostnej decydują również inne czynniki, takie jak mikroarchitektura kości oraz struktura kostna, których ocena nie jest możliwa w warunkach badania dwuwymiarowego DXA [243, 244]. Taką możliwość daje dopiero tomografia komputerowa. W naszych badaniach, analizie tomograficznej podlegały izolowane kości piszczelowe, które oceniano z wykorzystaniem dwóch technik, tj.: obwodowej ilościowej tomografii komputerowej (pQCT) [245] oraz mikrotomografii komputerowej (µ-CT) [246].

Obwodowa ilościowa tomografia komputerowa pQCT (ang. Peripheral Quantitative Computed Tomography) jest obecnie jedną z najnowocześniejszych technik pozwalających na nieinwazyjne pomiary gęstości kości zarówno w materiale izolowanym pośmiertnie, jak również przyżyciowo [244]. pQCT umożliwia pomiar rzeczywistej, wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej, różnicując ją przy tym na tkankę kostną zbitą (korową) i gąbczastą (beleczkową) [247, 248]. Obwodowa ilościowa tomografia komputerowa rejestruje także dane dotyczące geometrii przekroju w oparciu o obrysy obydwu struktur kostnych. Pozwala także na obliczenia charakterystyki wytrzymałościowej przekroju kości. Metoda ta opiera się

na stwierdzeniu, że o wytrzymałości kości decyduje struktura korowa, jej rozmieszczenie na obwodzie, przekrój oraz grubość. Ze względu na fakt, że metoda DXA umożliwia badanie przyżyciowe, to oba te postępowania diagnostyczne doskonale się uzupełniają i stanowią podstawę do kompleksowej oceny tkanki kostnej w warunkach badań klinicznych u ludzi, jak i doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych [244, 249, 250].

Tkanka kostna zbita cechuje się dużą odpornością na czynniki warunkujące jej degradację, w efekcie czego zmiany zanikowe obserwowane w warunkach doświadczalnie indukowanej osteopenii są nieznaczne. Yeh i in. [251] nie stwierdzili żadnych istotnych zmian parametrów densytometrycznych i strukturalnych trzonu kości u orchidektomizowanych szczurów. Zauważyć jednak należy, że autorzy oceniali zmiany zachodzące w kościach już po 4 tyg. od zabiegu gonadektomii. Okres ten wydaje się być zbyt krótki w przypadku szczurów, natomiast jest on wystarczający u samców myszy, co wykazali Moverare i in. [252]. Dane literaturowe wskazują, że zmiany zanikowe tkanki kostnej zbitej u szczurów najczęściej analizuje się dopiero 60 dni po amputacji gonad [213, 238]. Założenia metodyczne naszych badań również zakładały 60-dniowy okres rozwoju osteopenicznych zmian zanikowych. W ich efekcie stwierdzono statystycznie istotne, choć tylko nieco ponad 3%, zmniejszenie wolumetrycznej gęstości mineralnej tkanki kostnej zbitej (Ct.vBMD). Stwierdzono również mniejszą zawartość mineralną (Ct.BMC) oraz powierzchnię (Ct.Ar) tkanki kostnej zbitej, choć w przypadku tej ostatniej nie wykazano statystycznej zależności, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [253, 254]. Efekty stosowania pyłku sosnowego w odniesieniu do tkanki kostnej zbitej cechowało zróżnicowanie wynikające z zastosowanej dawki. Podawanie szczurom niższej dawki pyłku nie wywarło żadnego

efektu. Skuteczna, w zapobieganiu rozwoju zmian zanikowych tkanki kostnej zbitej, okazała się być dopiero większa dawka, utrzymując stopień jej mineralizacji na poziomie jak u kontrolnych szczurów operowanych rzekomo (SHO) oraz otrzymujących testosteron. Interesujące są również zmiany geometryczne trzonu, które analizowane było w 50% długości kości piszczelowych. Orchidektomia pozostała bez istotnego wpływu na podokostnową resorpcję tkanki kostnej, efektem czego nie stwierdzono istotnych różnic wielkości obwodu zewnątrzkostnego trzonu kości piszczelowych pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczenia. Odnotowano natomiast zwiększenie wielkości obwodu wewnętrznego trzonu. Świadczy to o intensyfikacji procesów resorpcyjnych w obrębie jamy szpikowej. Jednak wzrost ten obserwowany był wyłącznie w grupie kontrolnej orchidektomizowanych szczurów (ORX-PhS) oraz w grupie stosowania pyłku sosnowego w dawce 50 mg/kg m.c. Obserwacje te zbieżne są wynikami opublikowanymi przez innych autorów [149, 255]. Co ciekawe, Saxon i Turner [149] dowiedli odmienności zmian zanikowych w obrębie trzonu kości u samic i samców. W warunkach braku wpływu hormonów gonadalnych, u samic obserwuje się zwiększenie wielkości obwodu zewnątrzkostnego, nazywanego również podokostnowym, w następstwie uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych, związanych z formowaniem tkanki kostnej. Zwiększa się również wielkość obwodu wewnątrzkostnego, co wynika z intensyfikacji resorpcji od strony jamy szpikowej. Zauważyć należy, że resorpcja tkanki kostnej w obrębie jamy szpikowej jest intensywniejsza niż podokostnowe formowanie, co finalnie prowadzi do zmniejszenia grubości ściany trzonu kości. U samców, w następstwie braku oddziaływania hormonów pochodzenia gonadalnego, również obserwowana jest intensyfikacja resorpcji kości od strony jamy szpikowej, prowadząca do zwiększenia wielkości obwodu wewnętrznego (śródkostnego). Dodać należy,

że resorpcja ta ma intensywniejszy przebieg u samic niż u samców. Natomiast obwód zewnątrzkostny nie ulegał znaczącym zmianom lub zmniejszył się, co jest związane ze zwiększoną resorpcją podokostnową [149, 256]. Podawanie testosteronu oraz pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. skutkowało zahamowaniem procesów resorpcyjnych i utrzymaniem wielkości obwodu wewnętrznego na poziomie grupy SHO.

Mimo odmienności płciowej charakteru zmian metabolicznych w obrębie trzonu kości, to zarówno u samic, jak i samców prowadzą one do zmniejszenia grubości warstwy tkanki kostnej zbitej (Ct.Th) [149, 256-258]. Również i w naszych badaniach efektem zmian wielkości obwodów zewnętrznego i wewnętrznego trzonu kości piszczelowych samców były zmiany grubości warstwy tkanki kostnej zbitej manifestujące się istotnym jej ścieńczeniem w grupie ORX-PhS oraz ORC-PP50, podczas gdy w grupie ORX-PP150 Ct.Th nie odbiegała od tej, jaka została stwierdzona w kontrolnych grupach SHO i ORX-TEST.

Tkanka kostna gąbczasta cechuje się zdecydowanie większą wrażliwością na wszelkie oddziaływania, mające wpływ na jej metabolizm, w porównaniu z tymi obserwowanymi w tkance kostnej zbitej, co zostało udokumentowane w licznych opracowaniach [251, 259, 260]. Potwierdzają to również wyniki badań własnych, w których tomograficzna analiza tkanki kostnej gąbczastej orchidektomizowanych szczurów grupy kontrolnej (ORX-PhS) wykazały 16% zmniejszenie Tot.BMC, 10% Tot.vBMD oraz 20% mniejszą powierzchnię przekroju całkowitego kości piszczelowych mierzonych w bliższej części przynasadowej. Odrębna analiza, uwzględniająca wyłącznie tkankę kostną gąbczastą, również wykazała znaczące zmniejszenie stopnia mineralizacji, czego wyrazem są niższe wartości Tb.BMC (42%),

Tb.vBMD (31%) oraz Tb.Ar (17%) w porównaniu z grupą SHO. Znacząco niższa mineralizacja (Tb.BMC i Tb.vBMD) oraz powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej odnotowana została także w grupie stosowania niższej dawki pyłku sosnowego (ORX-PP50). Różnice te wynosiły odpowiednio 30%, 22% i 7,5%. Mimo intensywnej resorpcji tkanki kostnej gąbczastej kości piszczelowych samców w grupie ORX-PP50, to zauważyć jednak należy częściowy osteoprotekcyjny wpływ tej dawki pyłku sosnowego, co wyrażało się znamiennie wyższą mineralizacją i powierzchnią względem grupy orchidektomizowanych samców kontrolnych (ORX-PhS). Skuteczne ograniczenie zmian zanikowych tkanki kostnej gąbczastej stwierdzone zostało w grupie otrzymującej pyłek sosnowy w dawce 150 mg/kg m.c. mimo, że Tb.BMC oraz Tb.vBMD badanych kości cechowała tendencja do niższych wartości *vs.* SHO.

Analiza tkanki kostnej gąbczastej z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej (μ-CT) pozwoliła na wyjaśnienie przyczyn tych zmian. Stwierdzono bowiem znamienne zmniejszenie zarówno grubości, jak i liczby beleczek kostnych oraz zwiększenie przestrzeni między nimi w obrębie bliższej części przynasadowej kości piszczelowych orchidektomizowanych samców w grupie ORX-PhS. Podobne zmiany opisane zostały również przez innych autorów. [233, 261]. Podobne zmiany w strukturze beleczek kostnych odnotowano w grupie stosowania pyłku sosnowego w dawce 50 mg/kg. Zauważyć jednak należy, że zastosowanie niższej dawki pyłku sosnowego ograniczało zmiany zanikowe w strukturze i przestrzennym rozmieszczeniu beleczek kostnych, warunkowanych orchidektomią, co częściowo potwierdza osteoprotekcyjny wpływ dawki 50 mg/kg na tkankę kostną gąbczastą. Najskuteczniejszą w przeciwdziałaniu zmianom zanikowym była dawka 150 mg/kg

m.c., która pozwoliła zahamować resorpcję beleczek kostnych, a ich grubość, liczba i układ przestrzenny nie odbiegał istotnie od grup kontrolnych (SHO i ORX-TEST).

Teoria „mechanostatu", określana również mianem biomechaniki kości, zaproponowana przez Frosta i in. w 1998 r. [262] sugeruje, że osteoblasty i osteoklasty, które są komórkami odpowiedzialnymi za modelowanie i przebudowę kości, mają duży wpływ na geometrię kości. Osteocyty, które są zamknięte w macierzy kostnej, są w stanie wykrywać naprężenia generowane przez mechaniczne obciążanie kości w wyniku codziennej aktywności fizycznej. Uważa się, że osteocyty komunikują się z sąsiednimi osteoblastami i osteoklastami, wpływając na kierunek i tempo modelowania oraz zdolność tkanki kostnej do samonaprawy mikrouszkodzeń. Procesy te podlegają również kontroli czynników endokrynno-metabolicznych, a także wynikają z oddziaływania siły mięśniowej [263, 264]. W ten sposób kości są w stanie dostosować się do maksymalnych sił generowanych przez mięśnie w różnych miejscach ciała w warunkach fizjologicznych na drodze usuwania i dodawania tkanki kostnej w różnych obszarach szkieletu, w zależności od wykrywanych przez osteocyty gradientów odkształceń [263, 265, 266]. Zgodnie z tą teorią proponuje się trzy różne etiologie osteopenii i chorób osłabiających kości: pierwotną (związana z czynnikami genetycznymi), związaną z brakiem aktywności fizycznej oraz ogólnoustrojową (spowodowaną czynnikami endokrynno-metabolicznymi) [168, 267, 268]. Słuszność twierdzeń tej teorii potwierdzają badania Stuermera i in. (2010), którzy owariektomizowane samice szczurów poddawali wibracji o pionowej osiowości z częstotliwością 90 Hz i amplitudzie 0,5 mm. Wykazali oni, że wibracja wpływa korzystnie na układ kostny oraz mięśniowy [269]. Niedobór testosteronu u mężczyzn wiąże się z utratą masy mięśni szkieletowych, co przyczynia się do niekorzystnych

skutków zdrowotnych. Mechanizmy, przez które niedobór testosteron prowadzi do utraty masy mięśni szkieletowych, pozostają słabo zrozumiane. W stanie równowagi, masę mięśni szkieletowych można postrzegać jako netto równowagę między syntezą białek mięśniowych, a ich degradacją [270, 271]. Stymulacja procesów anabolicznych mięśni poprzez obciążenia mechaniczne oraz suplementacja składników odżywczych prowadzą do wzrostu masy mięśniowej poprzez zwiększenie bilansu netto białka [272], podczas gdy stymulatory kataboliczne, takie jak głodzenie [273] i brak obciążenia mechanicznego [274, 275], powodują szybką atrofię mięśni. Dlatego utrata masy mięśniowej w odpowiedzi na brak androgenów może wynikać z obniżonej syntezy białek mięśniowych, zwiększonej ich degradacji lub kombinacji tych procesów [276-278]. Z kolei Hourde i in. [279] udokumentowali, że podawanie androgenów kastrowanym samcom szczurów wywiera korzystny wpływ na wydajność mięśni. Autorzy ci sugerują również, iż działanie androgenów na mięśnie i kości uczestniczy w całościowej poprawie stanu układu mięśniowo-szkieletowego w warunkach braku aktywności hormonalnej gonad. Interesujące są również badania Wanga i in. [280], którzy dowodzą, że siła mięśni, mająca bezpośredni wpływ na jakość tkanki kostnej, wynika przede wszystkich z ich gęstości oraz powierzchni. Jak już wcześniej wspomniano mięśnie pozostając w bezpośredniej zależności czynnościowej mają kluczowe znaczenie dla metabolizmu tkanki kostnej. Dlatego równolegle realizowanym celem badań własnych było określenie wpływu gonadektomii oraz różnych dawek pyłku sosnowego na cechy mięśni podudzia. Analiza tkanki mięśniowej przeprowadzona została z wykorzystaniem pQCT i procedury pomiarowej zaproponowanej przez Frank-Wilsona i in. [281], a za miejsce pomiarowe wybrano 50% długości kości piszczelowych, podobnie jak w przypadku analizy tkanki kostnej zbitej oraz badań wytrzymałościowych. Uzyskane wyniki wskazują, że w następstwie

orchidektomii znamiennie zmniejszyło się pole powierzchni przekroju poprzecznego (CSA) oraz gęstość mięśni (MD) w grupie ORX-PhS. Wyniki naszych badań potwierdzają pośrednio obserwacje Hansona i in. którzy wykazali zmniejszenie masy i siły mięśniowej u orchidektomizowanych szczurów [282]. W następstwie orchidektomii zwiększeniu uległa także powierzchnia tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT) oraz tkanki tłuszczowej śródmięśniowej (IMAT), co potwierdzają również inne badania [283, 284]. Osłabienie mięśni oraz zwiększenie zawartości tkanki tłuszczowej stwierdzone zostało również w grupie stosowania niższej dawki pyłku sosnowego. Zauważyć jednak należy, że podawanie pyłku sosnowego w dawce 50 mg/kg m.c. zaznaczyło się zauważalnym ochronnym wpływem na mięśnie, czego wyrazem była mniejsza różnica analizowanych parametrów względem grupy SHO. Najefektywniejszym było podawanie pyłku sosnowego w dawce 150 mg/kg m.c. Gęstość i powierzchnia badanych mięśni była zbliżona do wartości odnotowanych w grupie SHO. Zauważyć należy, że w przypadku gęstości mięśni, stosowanie tej dawki pyłku było skuteczniejsze niż podawanie testosteronu, co zostało statystycznie udokumentowane. Wyższa dawka pyłku sosnowego ograniczała również powierzchnię podskórnej i śródmięśniowej tkanki tłuszczowej.

Omówiony powyżej wpływ zależności pomiędzy tkanką mięśniową a mineralizacją tkanki kostnej potwierdza analiza korelacji. Wynika z niej, że mCSA oraz MD są istotnie i pozytywnie skorelowane z zarówno z zawartością i gęstością mineralną całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych. Natomiast ujemna, istotna korelacja wykazana została przy porównaniu parametrów densytometrycznych szkieletu i izolowanych kości piszczelowych w odniesieniu do IMAT i SAT (Tabela 8).

Tabela 8. Tabela korelacji parametrów densytometrycznych całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych względem parametrów tomograficznej oceny mięśni.

Parametr	MD (mg/cm^3)	mCSA (cm^2)	IMAT (cm^2)	SAT (cm^2)
Ts.BMD (g/cm^2)	0,4914 P = 0,002	0,5037 P = 0,001	-0,5079 P = 0,001	-0,3697 P = 0,024
Ts.BMC (g)	0,6167 P = 0,000	0,6495 P = 0,000	-0,6306 P = 0,000	-0,5409 P = 0,001
t.BMD (g/cm^2)	0,5087 P = 0,001	0,5527 P = 0,000	-0,5261 P = 0,001	-0,4151 P = 0,011
t.BMC (g)	0,4587 P = 0,004	0,4817 P = 0,003	-0,5121 P = 0,001	-0,4120 P = 0,011

Objaśnienia: Wartości liczbowe zawarte w tabeli przedstawiają współczynniki korelacji *r* oraz wartość poziomu istotności P. Wszystkie wartości współczynników korelacji zawarte w tabeli są statystycznie istotne przy $P < 0,05$. mCSA – pole powierzchni przekroju mięśni; MD – Gęstość mięśni; IMAT – powierzchnia tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej; SAT – powierzchnia tkanki tłuszczowej podskórnej; Ts.BMD – gęstość mineralna całego szkieletu; Ts.BMC – zawartość mineralna całego szkieletu; t.BMD – gęstość mineralna izolowanych kości piszczelowych; t.BMC – zawartość mineralna izolowanych kości piszczelowych.

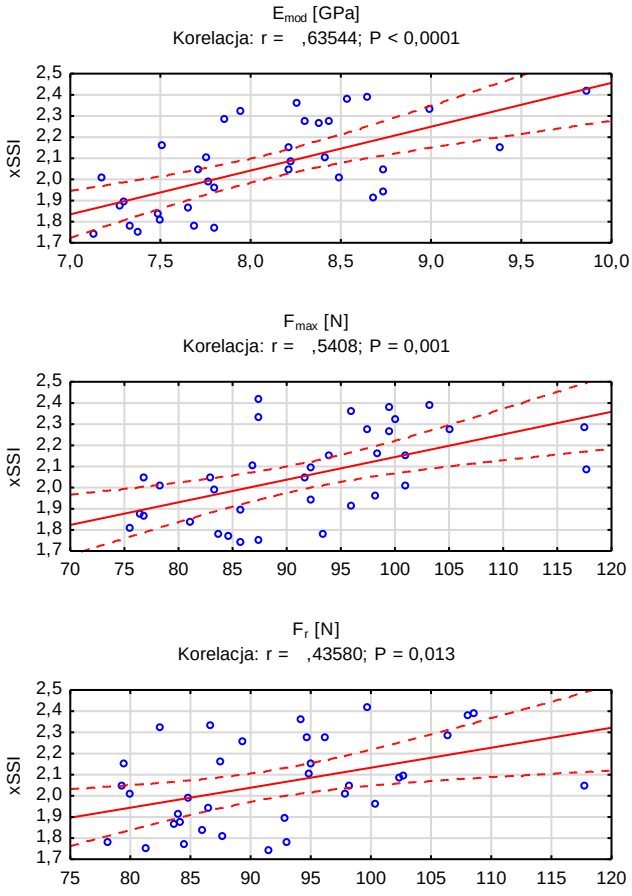
Definicja osteoporozy podkreśla, że w raz z rozwojem zmian zanikowych tkanki kostnej rośnie podatność kości na złamania [285]. Z tego powodu ważnym jest pozyskiwanie danych dotyczących wpływu stosowanych substancji na mechaniczną wytrzymałość kości. W tym celu szerokie zastosowanie mają metody, polegające na obciążeniach dynamicznych w trój- lub czteropunktowym teście ugięcia [286-288]. Badania wytrzymałościowe kości długich mogą być prowadzone w oparciu o wycięty fragment trzonu kości [289] lub na całych, izolowanych kościach [290, 291], przy czym ten ostatni sposób jest bardziej zbliżony do symulacji rzeczywistych sił działających na kość. W prezentowanych badaniach wykorzystano metodę trójpunktowego testu

ugięcia, który umożliwia określenie rzeczywistej wytrzymałości izolowanych kości na działanie sił odkształcających. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że analiza wytrzymałościowa izolowanych kości piszczelowych prowadzona była w oparciu o algorytm analizy modelu „rury", jaką w rzeczywistości jest kość długa, a nie „pręta", co jest często popełnianym błędem w tego typu pomiarach. Taktowanie kości jako „pręt" wynika z możliwości określenia jedynie średnicy zewnętrznej izolowanej kości. Natomiast niemożliwym jest określenie średnicy wewnętrznej trzonu kości w punkcie działania głowicy maszyny wytrzymałościowej, bez jej uprzedniego uszkodzenia. Średnice wewnętrzną trzonu możemy zmierzyć wykorzystując pQCT. Wprowadzenie do systemu komputerowego sterującego urządzeniem wytrzymałościowym wartości średnicy zewnętrznej i wewnętrznej trzonu kości pozwala na analizę kości jako model „rury". Ocena wytrzymałości mechanicznej oparta została na pomiarze trzech parametrów tj. siły maksymalnej, przy której dochodzi do złamania kości, modułu elastyczności Young'a oraz sprężystości. Wykazaliśmy, że eliminacja wpływu hormonów gonadalnych zmniejsza wytrzymałość mechaniczną kości, co znajduje swoje odzwierciedlenie w wartościach ocenianych parametrach. Podobne rezultaty zostały przedstawione przez innych autorów [255, 257, 292]. Zastosowanie większej dawki pyłku sosnowego skutecznie zahamowało obniżenie właściwości mechanicznych, a oceniane parametry wytrzymałości mechanicznej kości piszczelowych kształtowały się na poziomie grup kontrolnych SHO oraz ORX-TEST. Zależności takiej nie stwierdzono u szczurów otrzymujących mniejszą dawkę pyłku, a wytrzymałość mechaniczna ich kości nie odbiegała od kontrolnej grupy ORX-PhS.

Badanie wytrzymałości kości z wykorzystaniem trójpunktowego testu ugięcia jako obciążenia dynamicznego, ze względu na jego uszkadzający charakter możliwe

jest jedynie pośmiertnie. Metodą przyżyciową, która pozwala na prognozowanie wytrzymałości mechanicznej bez uszkodzenia kości jest obwodowa ilościowa tomografia komputerowa (pQCT). Przy jej użyciu możliwe jest określenie osiowego wskaźnika siła-odkształcenie (xSSI), a tym samym przewidywanie wytrzymałości mechanicznej kości w jej dowolnie wybranym miejscu [293, 294]. W badaniach naszych, pomiar xSSI przeprowadzony został w tym samym miejscu, co późniejsze badanie wytrzymałościowe w trójpunktowym teście ugięcia. Charakter zmian wskaźnika xSSI był identyczny w porównaniu z parametrami rzeczywistej wytrzymałości mechanicznej izolowanych kości piszczelowych.

Rycina 14. Analiza korelacja wskaźnika xSSI oraz parametrów wytrzymałościowych zmierzonych podczas badania w trójpunktowym teście ugięcia.



Zasadność wykorzystania wskaźnika xSSI do oceny przewidywanej wytrzymałości mechanicznej kości potwierdza dodatnia i statystycznie istotna jego korelacja z parametrami wytrzymałościowymi, zmierzonymi podczas analizy w trójpunktowym teście ugięcia (Rycina 14). Podobne obserwacje opisane zostały przez Ferrettiego i in. [295, 296].

Biochemiczne wskaźniki przebudowy tkanki kostnej są istotnymi indykatorami procesów w niej zachodzących w przebiegu chorób metabolicznych, a także po zastosowaniu preparatów, których użycie ma na celu przeciwdziałanie tym chorobom. Ich wartość diagnostyczna pozwala również na poznanie charakteru i intensywności obrotu kostnego. Tym samym są one ważnym źródłem informacji o efektywności zastosowanych postępowań terapeutycznych w zakresie przeciwdziałania zmianom zanikowym tkanki kostnej. [297, 298]. Do wskaźników o kluczowym znaczeniu należą osteokalcyna, frakcja kostna fosfatazy zasadowej oraz C-końcowy usieciowany telopeptyd łańcucha kolagenu typu I. Osteokalcyna (OC) i frakcja kostna fosfatazy zasadowej (bALP) są dwoma wskaźnikami informującymi o aktywności osteoblastycznej. OC, znana również jako białko γ-karboksylowane, jest wytwarzana głównie przez osteoblasty, odontoblasty i hipertroficzne chondrocyty. Jest to białko zaangażowane w mineralizację kości, czyli proces, w którym sole mineralne są odkładane w tkance kostnej, nadając jej twardość i wytrzymałość. Poziom osteokalcyny we krwi jest stosowany jako wskaźnik aktywności osteoblastów i mineralizacji kości.

Wyniki naszych badań wskazują na zmniejszenie poziomu OC w osoczu krwi orchidektomizowanych szczurów i potwierdzają obserwacje innych autorów [299, 300]. Znaczące obniżenie poziomu OC odnotowane zostało w grupie samców ORX

otrzymujących pyłek sosnowy w dawce 50 mg/kg m.c. Zauważyć należy, że podawanie testosteronu oraz większej dawki pyłku sosnowego nie wpłynęło istotnie na poziom OC, co upoważnia do twierdzenia, że poziom mineralizacji i aktywność osteoblastów w tych grupach są podobne jak w grupie SHO.

O aktywności metabolicznej osteoblastów świadczy również stężenie frakcji kostnej alkalicznej fosfatazy (bALP). Poziom tego wskaźnika uległ znaczącemu obniżeniu w kontrolnej grupie orchidektomizowanej (ORX-PhS). Zależność taką potwierdzają również badania Chena i in. [301], Chen i in. [302] oraz Sakr i in. [303]. Istotne obniżenie poziomu bALP odnotowano również w grupie ORX-PP50. Podkreślić jednak należy, że był on o blisko 17% wyższy niż w grupie ORX-PhS. Ta zwiększona aktywność osteoblastyczna wynikać może z zauważalnego, pobudzającego wpływu tej dawki pyłku sosnowego na metabolizm tkanki kostnej (szczególnie zauważalny w tkance kostnej gąbczastej) na co wskazują również opisane powyżej analizy pQCT oraz μ-CT. Podawanie pyłku sosnowego w większej dawce oraz testosteronu nie tylko pozwoliło na utrzymanie aktywności osteoblastów na poziomie jak w grupie SHO, ale godnym uwagi jest 10% wzrost poziomu bALP w grupie ORX-PP150, w porównaniu z kontrolną grupą operowaną rzekomo.

Dla pełniejszego poznania i zrozumienia procesów metabolicznych tkanki kostnej zmierzone zostało stężenie C-końcowego usieciowionego telopeptydu łańcucha alfa kolagenu typu I (CTX-I). Zgodnie z oczekiwaniami, jego największy poziom stwierdzono w grupach ORX_PhS oraz ORX-PP50. Wzrost poziomu CTX-I w następstwie orchidektomii jest szeroko udokumentowany [304-306]. Co ciekawe, poziom tego wskaźnika metabolizmu nie uległ zmianie w grupach, gdzie podawano

testosteron oraz większą dawkę pyłku sosnowego, co świadczy o ustabilizowanym poziomie resorpcji kości, zbliżonym do tego, jaki występuje w grupie SHO.

6. WNIOSKI

1. Pyłek sosnowy wykazuje działanie osteoprotekcyjne u samców szczurów z rozwijającą się osteopenią indukowaną orchidektomią, a efekty kostne zależne są od użytej dawki.
2. Podawanie niższej dawki pyłku sosnowego tj. 50mg/kg m.c. skutkuje ograniczonym, osteoprotekcyjnym wpływem, ale wyłącznie w obrębie tkanki kostnej gąbczastej.
3. Zastosowanie pyłku sosnowego, w dawce 150 mg/kg m.c., całkowicie hamuje zmiany zanikowe kości, wywołane brakiem wpływu hormonów gonadalnych, zarówno w obrębie tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej.
4. Pyłek sosnowy stosowany w większej dawce hamuje kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, czego wyrazem jest utrzymanie ich gęstości i wielkości powierzchni na poziomie grupy operowanej rzekomo i grupy otrzymującej testosteron. Ta dawka pyłku sosnowego ograniczała również kumulację śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej.
5. Uzyskane wyniki dowodzą osteoprotekcyjnej skuteczności pyłku sosnowego, szczególnie podawanego w większych dawkach, co dowodzi możliwości jego wykorzystania w profilaktyce rozwoju osteoporozy u mężczyzn, jak i samców innych gatunków zwierząt.

7. SPIS SKRÓTÓW

μ-CT - mikrotomograficzna analiza morfometryczna tkanki

2BS - diploidalne ludzkie komórki fibroblastów

ANOVA – jednokierunkowa analiza wariancji

AR – receptor androgenowy

bALP – frakcja kostnej fosfatazy zasadowej

BMD - gęstość mineralna kości

BS – powierzchnia tkanki kostnej

BS/BV – indeks określający zawartość powierzchni zajmowanej przez tkankę kostną do jej objętości;

BS/TV – wskaźnik procentowej zawartości objętościowej tkanki kostnej

BV – objętość tkanki kostnej

cAMP - cykliczny adenozyno-3′,5′-monofosforan

CIA – zapalenie stawów indukowane kolagenem (ang. Collagen-Induced Arthritis)

CSA - pole powierzchni przekroju poprzecznego

Ct.Ar - powierzchnia tkanki kostnej zbitej

Ct.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej zbitej

Ct.Th - grubość tkanki kostnej zbitej

Ct.vBMD - wolumetryczna gęstość mineralna tkanki kostnej zbitej

CTX-I - C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I

DHEA – dehydroepiandrostenon

DHEAS - siarczanowy ester DHEA

DHT – dihydrotestosteron

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DXA - densytometria (ang. DXA – Dual X-Ray Absorptiometry)

E_{mod-} moduł elastyczności Younga

Endo.C - obwód wewnętrzny kości

eNOS - endotelialna syntaza tlenku azotu

ER - receptor estrogenowy

F_{max} -siła maksymalna

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów

F_r – wartość siły określającej granicę sprężystości

GDNF - czynnik neurotroficznego pochodzenia glejowego

HUVECs – komórki śródbłonka naczyniowego pępowiny ludzkiej (ang. Human umbilical vein endothelial cells)

IGF-I – insulinopodobny czynnik wzrostu I

IL-1 – interleukina 1

IL-1β - interleukina 1- beta

IL-2 – interleukina-2

IL-6 – interleukina 6

IMAT – powierzchnia tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej

LBP – kompleks polisacharydowy jagód Goji -łac. Lycium barbarum (ang. Lycium barbarum polysaccharide)

LDL - lipoproteiny o małej gęstości

MAPK-ERK kinase – kinaza serynowo-treoninowa er-Thr (ang. Ser/Thr protein kinase)

mCSA - powierzchnia przekroju poprzecznego mięśni

MD –gęstość mięśni

NO – tlenek azotu

OC - osteokalcyna

ORX – grupa poddana orchidektomii

ORX-PhS – grupa, której podawano płyn fizjologiczny

ORX-PP150 - grupa, której podawano pyłek sosnowy w dawce 150mg/kg m.c.

ORX-PP50 – grupa, której podawano pyłek sosnowy w dawce 50mg/kg m.c.

ORX-TEST – grupa, której podawano testosteron

p53 – białko p53

pCSMI - skręcający momentu bezwładności przekroju porzecznego

Peri.C - obwód zewnętrzny kości

PGE2 – prostaglandyna E2 (ang. prostaglandin E2)

PI3K/Akt – ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej (ang. the phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B intracellular signaling pathway)

pQCT– obwodowa ilościowa tomografia komputerowa (ang, Peripheral Quantitive Computed Tomografy)

PTH – parathormone

RANKL - ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (z ang. Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)

RTG – badanie radiologiczne

SA-B-Gal – beta-galaktozydaza związana ze starzeniem (ang. senescence-associated beta-galactosidase)

SAT - powierzchnia tkanki tłuszczowej podskórnej

SHBG - stężenie globuliny wiążącej hormony płciowe

SHO – grupa poddana pozornej gonadektomii

t.Ar – powierzchnia izolowanych kości piszczelowych

t.BMC – zawartość mineralna kości piszczelowych

t.BMD- gęstość mineralna kości piszczelowych

Tb.Ar - powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej

Tb.Ar- powierzchnia tkanki kostnej gąbczastej

Tb.BMC - zawartość mineralna tkanki kostnej gąbczastej

Tb.N – liczba beleczek kostnych przekroju kości.

Tb.Sp – średnia wielkość przestrzeni wolnych pomiędzy beleczkami

Tb.Th – grubość beleczek kostnych

TGF-beta – czynnik wzrostu beta

TGF-β- transformujący czynnik wzrostu beta

TNF-alfa - czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)

Tot.Ar - całkowita powierzchnia kości

Tot.BMC - całkowita zawartość mineralna kości

Tot.vBMD - całkowita wolumetryczna gęstość mineralna kości

Ts.Ar – powierzchnia tkanki kostnej całego szkieletu

Ts.BMC – zawartość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu

Ts.BMD – gęstość mineralna tkanki kostnej całego szkieletu

TV – całkowita objętość badanej próbki

V - prędkości głowicy pomiarowej

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

xCSMI – zginający moment bezwładności przekroju porzecznego

xSSI - wskaźnik siła-odkształcenie względem osi X

8. PIŚMIENNICTWO

1. Ciach T. Alternatywne systemy podawania leków. In: Warszawsza P, editor. Prace Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Warszawa.2009. p. 3.

2. Watkins ES. From history of pharmacy to pharmaceutical history. Pharm Hist. 2009;51(1):3-13

3. May KM, Sherman JB. The history of research in public health nursing education. NLN Publ. 1990(15-2339):147-78

4. Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. Essential Oils and Health. Yale J Biol Med. 2020;93(2):291-305

5. Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, Siafakas K, Argyropoulou A, Angelis A, et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (Pistacia lentiscus var. Chia, Anacardiaceae): A review. J Ethnopharmacol. 2020;254:112485:10.1016/j.jep.2019.112485.

6. Shen T, Li GH, Wang XN, Lou HX. The genus Commiphora: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 2012;142(2):319-30:10.1016/j.jep.2012.05.025.

7. Sarup P, Bala S, Kamboj S. Pharmacology and Phytochemistry of Oleo-Gum Resin of Commiphora wightii (Guggulu). Scientifica (Cairo). 2015;2015:138039:10.1155/2015/138039.

8. Jagtap UB, Bapat VA. Artocarpus: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 2010;129(2):142-66:10.1016/j.jep.2010.03.031.

9. Zhang C, Fan L, Fan S, Wang J, Luo T, Tang Y, et al. Cinnamomum cassia Presl: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology. Molecules. 2019;24(19):10.3390/molecules24193473.

10. Li KW, Liang YY, Xie SM, Niu FJ, Guo LY, Liu ZH, et al. Ixeris sonchifolia: a review of its traditional uses, chemical constituents, pharmacology and modern applications. Biomed Pharmacother. 2020;125:109869:10.1016/j.biopha.2020.109869.

11. Giermaziak W, Przyłuska, I. Medycyna naturalna dawniej i dziś. Forum Bibl Med. 2017;10 nr 1 (19):548, 9

12. Francia S, Stobart A. Critical Approaches to the History of Western Herbal Medicine. Stobart EbSFaA, editor: Bloomsbury Academic; 2014.

13. Salehi B, Quispe C, Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, Nigam M, Mishra AP, et al. Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. Front

Pharmacol. 2020;11:599959:10.3389/fphar.2020.599959.

14. Aanchal B, Chinmayee P. Medicinal Properties of Phytochemicals and Their Production. In: Hany AE-S, editor. Natural Drugs from Plants. Rijeka: IntechOpen; 2021. p. Ch. 10.

15. Ulanowska MO, Beata. Fitozwiązki - ważne składniki suplementów diety oraz ich wpływ na zdrowie człowieka. Kosmos Problemy Nauk Biologicznych, Polskie Towarzystwo Przyrodników im Kopernika 2021;70:https://doi.org/10.36921/kos.2021_2721.

16. Vilahur G, Ben-Aicha S, Diaz-Riera E, Badimon L, Padro T. Phytosterols and Inflammation. Curr Med Chem. 2019;26(37):6724-34:10.2174/0929867325666180622151438.

17. Fang F, Candy K, Melloul E, Bernigaud C, Chai L, Darmon C, et al. In vitro activity of ten essential oils against Sarcoptes scabiei. Parasites & Vectors. 2016;9(1):594:10.1186/s13071-016-1889-3.

18. Gizaw A, Marami LM, Teshome I, Sarba EJ, Admasu P, Babele DA, et al. Phytochemical Screening and In Vitro Antifungal Activity of Selected Medicinal Plants against Candida albicans and Aspergillus niger in West Shewa Zone, Ethiopia. Adv Pharmacol Pharm Sci. 2022;2022:3299146:10.1155/2022/3299146.

19. Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. Frontiers in Pharmacology. 2020;10:10.3389/fphar.2019.01614.

20. Dai C, Tian E, Hao Z, Tang S, Wang Z, Sharma G, et al. Aflatoxin B1 Toxicity and Protective Effects of Curcumin: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Antioxidants (Basel). 2022;11(10):10.3390/antiox11102031.

21. Czerpak R. Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin. KOSMOS 1993;42:613

22. Patra S, Gorai S, Pal S, Ghosh K, Pradhan S, Chakrabarti S. A review on phytoestrogens: Current status and future direction. Phytother Res. 2023:10.1002/ptr.7861.

23. Zhang ZB, Ip SP, Cho WC, Hu Z, Huang YF, Luo DD, et al. Evaluation of the effects of androgenic Chinese herbal medicines on androgen receptors and tumor growth in experimental prostate cancer models. J Ethnopharmacol. 2020;260:113058:10.1016/j.jep.2020.113058.

24. Song WO, Chun OK, Hwang I, Shin HS, Kim BG, Kim KS, et al. Soy isoflavones as safe functional ingredients. J Med Food. 2007;10(4):571-80:10.1089/jmf.2006.0620.

25. Nakai S, Fujita M, Kamei Y. Health Promotion Effects of Soy Isoflavones. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2020;66(6):502-7:10.3177/jnsv.66.502.

26. Krizova L, Dadakova K, Kasparovska J, Kasparovsky T. Isoflavones. Molecules. 2019;24(6):10.3390/molecules24061076.

27. Cvejić J, Bursać M, Atanacković M. Chapter 1 - Phytoestrogens: "Estrogene-Like" Phytochemicals. In: Atta ur R, editor. Studies in Natural Products Chemistry. 38: Elsevier; 2012. p. 1-35.

28. Vincent A, Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: are they useful in menopause? Mayo Clin Proc. 2000;75(11):1174-84:10.4065/75.11.1174.

29. Desmawati D, Sulastri D. Phytoestrogens and Their Health Effect. Open Access Maced J Med Sci. 2019;7(3):495-9:10.3889/oamjms.2019.044.

30. Liu J, Ho SC, Su YX, Chen WQ, Zhang CX, Chen YM. Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women: a meta-analysis of randomized controlled trials. Bone. 2009;44(5):948-53:10.1016/j.bone.2008.12.020.

31. Ricci E, Cipriani S, Chiaffarino F, Malvezzi M, Parazzini F. Soy isoflavones and bone mineral density in perimenopausal and postmenopausal Western women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Womens Health (Larchmt). 2010;19(9):1609-17:10.1089/jwh.2010.2021.

32. Wu GJ, Chen KY, Yang JD, Liu SH, Chen RM. Naringin Improves Osteoblast Mineralization and Bone Healing and Strength through Regulating Estrogen Receptor Alpha-Dependent Alkaline Phosphatase Gene Expression. J Agric Food Chem. 2021;69(44):13020-33:10.1021/acs.jafc.1c04353.

33. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. Obstet Gynecol. 2001;97(1):109-15:10.1016/s0029-7844(00)01080-2.

34. Wei P, Liu M, Chen Y, Chen DC. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. Asian Pac J Trop Med. 2012;5(3):243-8:10.1016/S1995-7645(12)60033-9.

35. Sathyapalan T, Aye M, Rigby AS, Fraser WD, Thatcher NJ, Kilpatrick ES, Atkin SL. Soy Reduces Bone Turnover Markers in Women During Early Menopause: A Randomized Controlled Trial. J Bone Miner Res. 2017;32(1):157-64:10.1002/jbmr.2927.

36. Abdi F, Alimoradi Z, Haqi P, Mahdizad F. Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials. Climacteric. 2016;19(6):535-45:10.1080/13697137.2016.1238451.

37. Park CY, Weaver CM. Vitamin D interactions with soy isoflavones on bone after menopause: a review. Nutrients. 2012;4(11):1610-21:10.3390/nu4111610.

38. Radhakrishnan G, Rashmi NA, Vaid NB. Evaluation of isoflavone rich soy protein supplementation for postmenopausal therapy. Pakistan J Nutr. 2009;8:1009-7

39. Qi S, Zheng H. Combined Effects of Phytoestrogen Genistein and Silicon on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rat. Biol Trace Elem Res. 2017;177(2):281-7:10.1007/s12011-016-0882-1.

40. Zhang DW, Wang ZL, Qi W, Zhao GY. The effects of Cordyceps sinensis phytoestrogen on estrogen deficiency-induced osteoporosis in ovariectomized rats. BMC Complement Altern Med. 2014;14:484:10.1186/1472-6882-14-484.

41. Liu J, Deng X, Liang X, Li L. The phytoestrogen glabrene prevents osteoporosis in ovariectomized rats through upregulation of the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. J Biochem Mol Toxicol. 2021;35(2):e22653:10.1002/jbt.22653.

42. Luo D, Liu Y, Zhou Y, Chen Z, Yang L, Liu Y, et al. Association between dietary phytoestrogen intake and bone mineral density varied with estrogen receptor alpha gene polymorphisms in southern Chinese postmenopausal women. Food Funct. 2015;6(6):1977-83:10.1039/c5fo00295h.

43. Collins JJ. Phytotherapeutic Management of Endocrine Dysfunctions. Nutrinews. 2006;8(1):1-8

44. Metka M. Phytoestrogens, phytogestagens and phytoandrogens. Journal fur Menopause. 2001;8:12-9

45. Ong VY, Tan BK. Novel phytoandrogens and lipidic augmenters from Eucommia ulmoides. BMC Complement Altern Med. 2007;7:3:10.1186/1472-6882-7-3.

46. Al-Qarawi AA, Abdel-Rahman HA, El-Badry AA, Harraz F, Razig NA, Abdel-Magied EM. The effect of extracts of Cynomorium coccineum and Withania somnifera on gonadotrophins and ovarian follicles of immature Wistar rats. Phytother Res. 2000;14(4):288-90:10.1002/1099-1573(200006)14:4<288::aid-ptr603>3.0.co;2-9.

47. Buhner SH. The Natural Testosterone Plan: For Sexual Health and Energy. Inner Traditions/Bear. 2007

48. Chrubasik JE, Roufogalis BD, Wagner H, Chrubasik S. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part II: urticae radix. Phytomedicine. 2007;14(7-8):568-79:10.1016/j.phymed.2007.03.014.

49. Iacono F, Prezioso D, Illiano E, Romeo G, Ruffo A, Amato B. Sexual asthenia:

Tradamixina versus Tadalafil 5 mg daily. BMC Surg. 2012;12 Suppl 1(Suppl 1):S23:10.1186/1471-2482-12-S1-S23.

50. Zhao J, Dasmahapatra AK, Khan SI, Khan IA. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (Turnera diffusa). J Ethnopharmacol. 2008;120(3):387-93:10.1016/j.jep.2008.09.016.

51. Lau BW, Lee JC, Li Y, Fung SM, Sang YH, Shen J, et al. Polysaccharides from wolfberry prevents corticosterone-induced inhibition of sexual behavior and increases neurogenesis. PLoS One. 2012;7(4):e33374:10.1371/journal.pone.0033374.

52. Liu M, Xiao GG, Rong P, Zhang Z, Dong J, Zhao H, et al. Therapeutic effects of radix dipsaci, pyrola herb, and Cynomorium songaricum on bone metabolism of ovariectomized rats. BMC Complement Altern Med. 2012;12:67:10.1186/1472-6882-12-67.

53. Yang WM, Kim HY, Park SY, Kim HM, Chang MS, Park SK. Cynomorium songaricum induces spermatogenesis with glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) enhancement in rat testes. J Ethnopharmacol. 2010;128(3):693-6:10.1016/j.jep.2010.02.020.

54. Cherdshewasart W, Nimsakul N. Clinical trial of Butea superba, an alternative herbal treatment for erectile dysfunction. Asian J Androl. 2003;5(3):243-6

55. Salvio G, Martino M, Giancola G, Arnaldi G, Balercia G. Hypothalamic-Pituitary Diseases and Erectile Dysfunction. J Clin Med. 2021;10(12):10.3390/jcm10122551.

56. Wang B, Wang S, Wang S, Gao Y. Study of the effect of super painkiller on the sexual function of male rats with type I diabetes. Zhonghua Nan Ke Xue. 2004;10(7):521-3

57. Zhou G, Wang CZ, Mohammadi S, Sawadogo WR, Ma Q, Yuan CS. Pharmacological Effects of Ginseng: Multiple Constituents and Multiple Actions on Humans. Am J Chin Med. 2023;51(5):1085-104:10.1142/S0192415X23500507.

58. Murphy LL, Lee TJ. Ginseng, sex behavior, and nitric oxide. Ann N Y Acad Sci. 2002;962:372-7:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04081.x.

59. Sandroni P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. Clin Auton Res. 2001;11(5):303-7:10.1007/BF02332975.

60. Furukawa T, Bai CX, Kaihara A, Ozaki E, Kawano T, Nakaya Y, et al. Ginsenoside Re, a main phytosterol of Panax ginseng, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones. Mol Pharmacol. 2006;70(6):1916-24:10.1124/mol.106.028134.

61. Edouard MJ, Miao L, Fan GW, Ojong BB, Zhen H, Zhang J, et al. Yang-tonifying traditional Chinese medicinal plants and their potential phytoandrogenic activity. Chin J Nat Med. 2014;12(5):321-34:10.1016/S1875-5364(14)60040-6.

62. Gan L, Hua Zhang S, Liang Yang X, Bi Xu H. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum. Int Immunopharmacol. 2004;4(4):563-9:10.1016/j.intimp.2004.01.023.

63. Zafar F, Asif HM, Shaheen G, Ghauri AO, Rajpoot SR, Tasleem MW, et al. A comprehensive review on medicinal plants possessing antioxidant potential. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2023;50(3):205-17:10.1111/1440-1681.13743.

64. Janeczko A. Estrogens and Androgens in Plants: The Last 20 Years of Studies. Plants. 2021;10(12):2783

65. Mai W, Chen D, Li X. Antioxidant Activity of Rhizoma Cibotii in vitro. Adv Pharm Bull. 2012;2(1):107-14:10.5681/apb.2012.015.

66. Li F, Boateng ID, Yang XM, Li Y, Liu W. Effects of processing methods on quality, antioxidant capacity, and cytotoxicity of Ginkgo biloba leaf tea product. J Sci Food Agric. 2023;103(10):4993-5003:10.1002/jsfa.12577.

67. Gomes TLN, Zenha RSS, Antunes AH, Faria FR, Rezende KR, de Souza EL, Mota JF. Evaluation of the Impact of Different Doses of Curcuma longa L. on Antioxidant Capacity: A Randomized, Double-Blind, Crossover Pilot Trial. Biomed Res Int. 2021;2021:3532864:10.1155/2021/3532864.

68. Gavin KM, Bessesen DH. Sex Differences in Adipose Tissue Function. Endocrinol Metab Clin North Am. 2020;49(2):215-28:10.1016/j.ecl.2020.02.008.

69. Linazasoro Calvo JM. Action of androgens of nitrogen retention in nephrectomised animals. Bull Inst Med Res Kuala Lumpur. 1954;7(2):49-52

70. Zerradi M, Dereumetz J, Boulet MM, Tchernof A. Androgens, body fat Distribution and Adipogenesis. Curr Obes Rep. 2014;3(4):396-403:10.1007/s13679-014-0119-6.

71. Giagulli VA, Castellana M, Pelusi C, Triggiani V. Androgens, Body Composition, and Their Metabolism Based on Sex. Front Horm Res. 2019;53:18-32:10.1159/000494900.

72. Lee NK, MacLean HE. Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. J Cell Physiol. 2011;226(6):1453-60:10.1002/jcp.22569.

73. Umapathysivam M, Grossmann M, Wittert GA. Effects of androgens on glucose metabolism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2022;36(5):101654:10.1016/j.beem.2022.101654.

74. Khoshkar Y, Vigneswaran HT, Eloranta S, Andersson TM, Schain F, Boman A, et al. Cardiovascular, bone, and metabolic health in men with castrate-resistant prostate cancer treated with androgen deprivation: a matched cohort study. Acta Oncol. 2022;61(11):1377-85:10.1080/0284186X.2022.2141077.

75. Singh J, Sahoo AK, Swain J, Mangaraj S, Kanwar JB, Manglunia A. Assessment of hypogonadism and its determinants among adult men with type 2 diabetes mellitus. Prim Care Diabetes. 2023:10.1016/j.pcd.2023.05.005.

76. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male R, Urology. Androgen deficiency in the aging male. Fertil Steril. 2008;90(5 Suppl):S83-7:10.1016/j.fertnstert.2008.08.094.

77. McClure RD. Androgen deficiency and the aging male: new urologic perspectives. Curr Urol Rep. 2001;2(6):453-9:10.1007/s11934-001-0039-3.

78. Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. Obes Rev. 2015;16(7):581-606:10.1111/obr.12282.

79. Miller KK. Androgen deficiency: effects on body composition. Pituitary. 2009;12(2):116-24:10.1007/s11102-008-0121-7.

80. Vermeulen A. Androgen replacement therapy in the aging male--a critical evaluation. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(6):2380-90:10.1210/jcem.86.6.7630.

81. Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, et al. Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. N Engl J Med. 2013;369(11):1011-22:10.1056/NEJMoa1206168.

82. Abbasi A, Duthie EH, Jr., Sheldahl L, Wilson C, Sasse E, Rudman I, Mattson DE. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, body composition, and physical fitness in independent community-dwelling older men and women. J Am Geriatr Soc. 1998;46(3):263-73:10.1111/j.1532-5415.1998.tb01036.x.

83. Racaru-Honciuc V, Betea D. [Endocrine changes with aging: physiological rather than pathological]. Rev Med Liege. 2014;69(5-6):329-36

84. Wittert G, Grossmann M. Obesity, type 2 diabetes, and testosterone in ageing men. Rev Endocr Metab Disord. 2022;23(6):1233-42:10.1007/s11154-022-09746-5.

85. Gianatti EJ, Grossmann M. Testosterone deficiency in men with Type 2 diabetes: pathophysiology and treatment. Diabet Med. 2020;37(2):174-86:10.1111/dme.13977.

86. Mani SB, Clavijo RI. Medical Treatment of Hypogonadism in Men. Urol Clin

North Am. 2022;49(2):197-207:10.1016/j.ucl.2021.12.008.

87. Niu YB, Li YH, Kong XH, Zhang R, Sun Y, Li Q, et al. The beneficial effect of Radix Dipsaci total saponins on bone metabolism in vitro and in vivo and the possible mechanisms of action. Osteoporos Int. 2012;23(11):2649-60:10.1007/s00198-012-1932-y.

88. NeuroExpert. Pyłek sosnowy | Pine Pollen NeuroExpert: https://neuroexpert.org/wiki/pylek-sosnowy-pine-pollen/; dostęp: 2023 [Available from: https://neuroexpert.org/wiki/pylek-sosnowy-pine-pollen/.

89. Mao GX, Zheng LD, Cao YB, Chen ZM, Lv YD, Wang YZ, et al. Antiaging effect of pine pollen in human diploid fibroblasts and in a mouse model induced by D-galactose. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:750963:10.1155/2012/750963.

90. Liang SB, Liang N, Bu FL, Lai BY, Zhang YP, Cao HJ, et al. The Potential Effects and Use of Chinese Herbal Medicine Pine Pollen (Pinus pollen): A Bibliometric Analysis of Pharmacological and Clinical Studies. World J Tradit Chin Med. 2020;6(2):163-70:10.4103/wjtcm.wjtcm_4_20.

91. Cheng Y, Wang Z, Quan Q, Xue C, Qu T, Wang T, et al. Pine pollen: A review of its chemical composition, health effects, processing, and food applications. Trends in Food Science & Technology. 2023;138:599-614:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.004.

92. Adenigba I, B.L.M., Tumbokon Serrano Jr., A.,. Androgenic and Anabolic Effects of Pinus tabulaeformis Carr. Pollen in Clarias gariepinus. The Israeli journal of aquaculture = Bamidgeh. 2017;69:2

93. Geng Y, Xing L, Sun M, Su F. Immunomodulatory effects of sulfated polysaccharides of pine pollen on mouse macrophages. Int J Biol Macromol. 2016;91:846-55:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.021.

94. Shang H, Niu X, Cui W, Sha Z, Wang C, Huang T, et al. Anti-tumor activity of polysaccharides extracted from Pinus massoniana pollen in colorectal cancer- in vitro and in vivo studies. Food Funct. 2022;13(11):6350-61:10.1039/d1fo03908c.

95. Ma D, Wang Z, He Z, Wang Z, Chen Q, Qin F, et al. Pine pollen extract alleviates ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 cells via MAPK signaling. Food Chem Toxicol. 2023;171:113550:10.1016/j.fct.2022.113550.

96. Valasco R, R., Drexel Jay, M., Natvidad, L., R., Abella, T., A.,, RAVELINA R. VELASCO DJMD, LEXTER R. NATIVIDAD AND TERESO A. ABELLA. Benguet Pine Pollen (Pinus kesiya) as natural source of phytoandrogen. IJBPAS. 2018;7:1122-3:https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2018/7.6.4472.

97. Morgan KC. Plants that contain testosterone. 2012

98. Aziz A, Mostary M, Sume I, Uddin H, Quader Khan M, Alam S, S. I. The efficacy of using pine (Pinus massoniana) pollen as an alternative to synthetic steroids in producing monosex male Nile tilapia (Oreochromis niloticus, L.). Aquaculture, Fish and Fisheries. 2022;2(5):375-83: https://doi.org/10.1002/aff2.59.

99. Lee KH, Choi EM. Effect of pine pollen extract on experimental chronic arthritis. Phytother Res. 2009;23(5):651-7:10.1002/ptr.2526.

100. Choi EM. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (Pinus densiflora) pollen extract. Phytother Res. 2007;21(5):471-5:10.1002/ptr.2103.

101. Wójcicka M, Skrzeczyńska, B., Biernacka, J., Stanisławska, I.,. Wpływ testosteronu na organizm człowieka. Edukacja biologiczna i środowiskowa. 2016;3/2016:42

102. Samaras N, Samaras D, Frangos E, Forster A, Philippe J. A review of age-related dehydroepiandrosterone decline and its association with well-known geriatric syndromes: is treatment beneficial? Rejuvenation Res. 2013;16(4):285-94:10.1089/rej.2013.1425.

103. Pitti-Ferrandi H. [DHEA and aging]. Psychol Neuropsychiatr Vieil. 2003;1(2):111-9

104. Kater CE, Giorgi RB, Costa-Barbosa FA. Classic and current concepts in adrenal steroidogenesis: a reappraisal. Arch Endocrinol Metab. 2022;66(1):77-87:10.20945/2359-3997000000438.

105. Załuska M, Bertrand, J.,. Dehydroepiandrosteron (DHEA)w mechanizmach stresu i depresji. Psychiatria Polska 2009;3:264

106. Laurent M, Antonio L, Sinnesael M, Dubois V, Gielen E, Classens F, Vanderschueren D. Androgens and estrogens in skeletal sexual dimorphism. Asian J Androl. 2014;16(2):213-22:10.4103/1008-682X.122356.

107. Ramachandran S, Williams SA, Weiss RJ, Wang Y, Zhang Y, Nsiah I, Bhattacharya K. Gender Disparities in Osteoporosis Screening and Management Among Older Adults. Adv Ther. 2021;38(7):3872-87:10.1007/s12325-021-01792-w.

108. Albright F, Reifenstein C. The parathyroid glands and metabolic bone disease. Baltimor: Williams and Wilkens Company; 1948. - p.

109. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. Endocr Rev. 2004;25(3):389-425:10.1210/er.2003-0003.

110. Cunha GR, Chung LW, Shannon JM, Taguchi O, Fujii H. Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. Recent Prog Horm Res. 1983;39:559-98:10.1016/b978-0-12-571139-5.50018-5.

111. Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, et al. Sex steroid actions in male bone. Endocr Rev. 2014;35(6):906-60:10.1210/er.2014-1024.

112. Wilson JD. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. N Engl J Med. 1972;287(25):1284-91:10.1056/NEJM197212212872508.

113. Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N. Aromatase in human bone tissue. J Bone MinerRes. 1997/9;12(9):1416-23

114. Saito H, Yanaihara T. Steroid formation in osteoblast-like cells. J IntMedRes. 1998/1;26(1):1-12

115. Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. Biochem Biophys Res Commun. 2005;328(3):688-96:10.1016/j.bbrc.2004.11.097.

116. Rochira V, Zirilli L, Madeo B, Aranda C, Caffagni G, Fabre B, et al. Skeletal effects of long-term estrogen and testosterone replacement treatment in a man with congenital aromatase deficiency: evidences of a priming effect of estrogen for sex steroids action on bone. Bone. 2007;40(6):1662-8:10.1016/j.bone.2007.01.022.

117. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. Cell. 2007;130(5):811-23:10.1016/j.cell.2007.07.025.

118. Lorenzo J. Sexual Dimorphism in Osteoclasts. Cells. 2020;9(9):10.3390/cells9092086.

119. Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y. Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts: generation and characterization of osteoclast-specific androgen receptor knockout mice. J Bone Miner Res. 2004;19((Suppl 1)):S3

120. Vanderschueren D, Gaytant J, Boonen S, Venken K. Androgens and bone. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2008;15(3):250-4:10.1097/MED.0b013e3282fe6ca9.

121. Venken K, De Gendt K, Boonen S, Ophoff J, Bouillon R, Swinnen JV, et al. Relative impact of androgen and estrogen receptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: a study in the androgen receptor knockout mouse model. J Bone Miner Res. 2006;21(4):576-85:10.1359/jbmr.060103.

122. Ohlsson C, Vandenput L. The role of estrogens for male bone health. Eur J Endocrinol. 2009;160(6):883-9:10.1530/EJE-09-0118.

123. Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Valero C, Zarrabeitia A, Amado JA, Gonzalez-Macias J, Riancho JA. Adiposity, estradiol, and genetic variants of steroid-metabolizing enzymes as determinants of bone mineral density. Eur J Endocrinol. 2007;156(1):117-22:10.1530/eje.1.02318.

124. Napoli N, Faccio R, Shrestha V, Bucchieri S, Rini GB, Armamento-Villareal R. Estrogen metabolism modulates bone density in men. Calcif Tissue Int. 2007;80(4):227-32:10.1007/s00223-007-9014-4.

125. Jones ME, Boon WC, McInnes K, Maffei L, Carani C, Simpson ER. Recognizing rare disorders: aromatase deficiency. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2007;3(5):414-21:10.1038/ncpendmet0477.

126. Swerdloff RS, Wang C. Androgens and the ageing male. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2004;18(3):349-62:10.1016/j.beem.2004.03.011.

127. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. J ClinInvest. 2000/12;106(12):1553-60

128. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. Recent Prog Horm Res. 2002;57:385-409:10.1210/rp.57.1.385.

129. Armstrong VJ, Muzylak M, Sunters A, Zaman G, Saxon LK, Price JS, Lanyon LE. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. J Biol Chem. 2007;282(28):20715-27:10.1074/jbc.M703224200.

130. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Androgens promote preosteoblast differentiation via activation of the canonical Wnt signaling pathway. Ann N Y Acad Sci. 2007;1116:423-31:10.1196/annals.1402.017.

131. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. Cell. 2011;144(5):796-809:10.1016/j.cell.2011.02.004.

132. Komori T. What is the function of osteocalcin? J Oral Biosci. 2020;62(3):223-7:10.1016/j.job.2020.05.004.

133. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. Int J Mol Sci. 2020;21(20):10.3390/ijms21207513.

134. Karsenty G. Osteocalcin: A Multifaceted Bone-Derived Hormone. Annu Rev Nutr. 2023;43:55-71:10.1146/annurev-nutr-061121-091348.

135. Berger JM, Karsenty G. Osteocalcin and the physiology of danger. FEBS Lett. 2022;596(5):665-80:10.1002/1873-3468.14259.

136. Fleet JC, Schoch RD. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. Crit Rev Clin Lab Sci. 2010;47(4):181-95:10.3109/10408363.2010.536429.

137. Somjen D, Katzburg S, Posner GH, Livne E, Kaye AM. Systemic treatments with the low-calcemic 1,25(OH)(2)D(3) analogs JKF or QW increase both the morphological and biochemical responses to estradiol-17beta in rat tibiae. J Cell Biochem. 2007;100(6):1406-14:10.1002/jcb.21143.

138. Pino AM, Rodriguez JM, Rios S, Astudillo P, Leiva L, Seitz G, et al. Aromatase activity of human mesenchymal stem cells is stimulated by early differentiation, vitamin D and leptin. J Endocrinol. 2006;191(3):715-25:10.1677/joe.1.07026.

139. Mani Maran RR, Sivakumar R, Ravisankar B, Valli G, Ravichandran K, Arunakaran J, Aruldhas MM. Growth hormone directly stimulates testosterone and oestradiol secretion by rat Leydig cells in vitro and modulates the effects of LH and T3. Endocr J. 2000;47(2):111-8:10.1507/endocrj.47.111.

140. Matsumoto C, Inada M, Toda K, Miyaura C. Estrogen and androgen play distinct roles in bone turnover in male mice before and after reaching sexual maturity. Bone. 2006;38(2):220-6:10.1016/j.bone.2005.08.019.

141. Callewaert F, Venken K, Kopchick JJ, Torcasio A, van Lenthe GH, Boonen S, Vanderschueren D. Sexual dimorphism in cortical bone size and strength but not density is determined by independent and time-specific actions of sex steroids and IGF-1: evidence from pubertal mouse models. J Bone Miner Res. 2010;25(3):617-26:10.1359/jbmr.090828.

142. Gori F, Hofbauer LC, Conover CA, Khosla S. Effects of androgens on the insulin-like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line. Endocrinology. 1999;140(12):5579-86:10.1210/endo.140.12.7213.

143. Meinhardt UJ, Ho KK. Modulation of growth hormone action by sex steroids. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;65(4):413-22:10.1111/j.1365-2265.2006.02676.x.

144. Scharf J, Ramadori G, Braulke T, Hartmann H. Synthesis of insulinlike growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit in primary cultures of rat hepatocytes, of Kupffer cells, and in cocultures: regulation by insulin, insulinlike growth factor, and growth hormone. Hepatology. 1996;23(4):818-27:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008666337.

145. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. Endocr Rev. 2008;29(5):535-59:10.1210/er.2007-0036.

146. Olson LE, Ohlsson C, Mohan S. The role of GH/IGF-I-mediated mechanisms in sex differences in cortical bone size in mice. Calcif Tissue Int. 2011;88(1):1-8:10.1007/s00223-010-9436-2.

147. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, et al. The

role of liver-derived insulin-like growth factor-I. Endocr Rev. 2009;30(5):494-535:10.1210/er.2009-0010.

148. Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. J Endocrinol. 2010;207(2):127-34:10.1677/JOE-10-0209.

149. Saxon LK, Turner CH. Estrogen receptor beta: the antimechanostat? Bone. 2005/2;36(2):185-92

150. Zamani M, Zamani V, Heidari B, Parsian H, Esmaeilnejad-Ganji SM. Prevalence of osteoporosis with the World Health Organization diagnostic criteria in the Eastern Mediterranean Region: a systematic review and meta-analysis. Arch Osteoporos. 2018;13(1):129:10.1007/s11657-018-0540-7.

151. Salari N, Darvishi N, Bartina Y, Larti M, Kiaei A, Hemmati M, et al. Global prevalence of osteoporosis among the world older adults: a comprehensive systematic review and meta-analysis. J Orthop Surg Res. 2021;16(1):669:10.1186/s13018-021-02821-8.

152. Xiao PL, Cui AY, Hsu CJ, Peng R, Jiang N, Xu XH, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis. Osteoporos Int. 2022;33(10):2137-53:10.1007/s00198-022-06454-3.

153. Vilaca T, Eastell R, Schini M. Osteoporosis in men. Lancet Diabetes Endocrinol. 2022;10(4):273-83:10.1016/S2213-8587(22)00012-2.

154. Bandeira L, Silva BC, Bilezikian JP. Male osteoporosis. Arch Endocrinol Metab. 2022;66(5):739-47:10.20945/2359-3997000000563.

155. Bruhn R, Pedersen AB, Heide-Jorgensen U, Ehrenstein V. Epidemiology of male osteoporosis in Denmark (1996-2018). Osteoporos Int. 2023;34(5):935-42:10.1007/s00198-023-06720-y.

156. Alswat KA. Gender Disparities in Osteoporosis. J Clin Med Res. 2017;9(5):382-7:10.14740/jocmr2970w.

157. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 2006;17(12):1726-33:10.1007/s00198-006-0172-4.

158. Rao SS, Budhwar N, Ashfaque A. Osteoporosis in men. Am Fam Physician. 2010;82(5):503-8

159. Fink HA, Ewing SK, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Taylor BC, Cauley JA, Orwoll ES. Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(10):3908-15:10.1210/jc.2006-0173.

160. Lassemillante AC, Doi SA, Hooper JD, Prins JB, Wright OR. Prevalence of osteoporosis in prostate cancer survivors: a meta-analysis. Endocrine. 2014;45(3):370-81:10.1007/s12020-013-0083-z.

161. Meier C, Nguyen TV, Handelsman DJ, Schindler C, Kushnir MM, Rockwood AL, et al. Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. Arch Intern Med. 2008;168(1):47-54:10.1001/archinternmed.2007.2.

162. Szulc P, Claustrat B, Marchand F, Delmas PD. Increased risk of falls and increased bone resorption in elderly men with partial androgen deficiency: the MINOS study. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5240-7:10.1210/jc.2003-030200.

163. Cauley JA, Ewing SK, Taylor BC, Fink HA, Ensrud KE, Bauer DC, et al. Sex steroid hormones in older men: longitudinal associations with 4.5-year change in hip bone mineral density--the osteoporotic fractures in men study. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(9):4314-23:10.1210/jc.2009-2635.

164. Mellstrom D, Johnell O, Ljunggren O, Eriksson AL, Lorentzon M, Mallmin H, et al. Free testosterone is an independent predictor of BMD and prevalent fractures in elderly men: MrOS Sweden. J Bone Miner Res. 2006;21(4):529-35:10.1359/jbmr.060110.

165. Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(2):89-95:10.1016/j.tem.2009.09.002.

166. Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. J Bone Miner Res. 2000;15(11):2169-77:10.1359/jbmr.2000.15.11.2169.

167. Weber TJ. Battle of the sex steroids in the male skeleton: and the winner is. J Clin Invest. 2016;126(3):829-32:10.1172/JCI85006.

168. Aghamohammadi D, Dolatkhah N, Shakouri SK, Hermann P, Eslamian F. Ginger (Zingiber officinale) and turmeric (Curcuma longa L.) supplementation effects on quality of life, body composition, bone mineral density and osteoporosis related biomarkers and micro-RNAs in women with postmenopausal osteoporosis: a study protocol for a randomized controlled clinical trial. J Complement Integr Med. 2020;18(1):131-7:10.1515/jcim-2020-0017.

169. LeBlanc ES, Nielson CM, Marshall LM, Lapidus JA, Barrett-Connor E, Ensrud KE, et al. The effects of serum testosterone, estradiol, and sex hormone binding globulin levels on fracture risk in older men. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(9):3337-46:10.1210/jc.2009-0206.

170. Woo J, Kwok T, Leung JC, Ohlsson C, Vandenput L, Leung PC. Sex steroids and bone health in older Chinese men. Osteoporos Int. 2012;23(5):1553-62:10.1007/s00198-011-1552-y.

171. Rabijewski M, Papierska, L., Kozakowski, J., Zgliczyński, W.,. Osteoporoza u mężczyzn— przyczyny, zapobieganiei leczenie. Gerontologia Polska.15:54

172. Kirby DJ, Buchalter DB, Anil U, Leucht P. DHEA in bone: the role in osteoporosis and fracture healing. Arch Osteoporos. 2020;15(1):84:10.1007/s11657-020-00755-y.

173. D'Amelio P, Roato I, D'Amico L, Veneziano L, Suman E, Sassi F, et al. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. Osteoporos Int. 2011;22(11):2869-77:10.1007/s00198-010-1496-7.

174. Nieves JW. Sex-Differences in Skeletal Growth and Aging. Curr Osteoporos Rep. 2017;15(2):70-5:10.1007/s11914-017-0349-0.

175. Zheng XQ, Lin JL, Huang J, Wu T, Song CL. Targeting aging with the healthy skeletal system: The endocrine role of bone. Rev Endocr Metab Disord. 2023;24(4):695-711:10.1007/s11154-023-09812-6.

176. Giustina A, Bouillon R, Dawson-Hughes B, Ebeling PR, Lazaretti-Castro M, Lips P, et al. Vitamin D in the older population: a consensus statement. Endocrine. 2023;79(1):31-44:10.1007/s12020-022-03208-3.

177. Kiani AK, Dhuli K, Donato K, Aquilanti B, Velluti V, Matera G, et al. Main nutritional deficiencies. J Prev Med Hyg. 2022;63(2 Suppl 3):E93-E101:10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2752.

178. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. Endocr Rev. 2001;22(4):477-501:10.1210/edrv.22.4.0437.

179. Metter EJ, Conwit R, Tobin J, Fozard JL. Age-associated loss of power and strength in the upper extremities in women and men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997;52(5):B267-76:10.1093/gerona/52a.5.b267.

180. Altan H, Tosun G, Sen Y. Idiopathic Juvenile Osteoporosis: A Case Report. J Clin Diagn Res. 2015;9(8):ZD10-2:10.7860/JCDR/2015/12928.6358.

181. Mancini A, Raimondo S, Di Segni C, Persano M, Di Geronimo E, Silvestrini A, et al. Comparison of plasma antioxidant levels in middle-aged and old male with idiopatic osteoporosis: preliminary data. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(14):2013-9

182. Dabas A, Malhotra R, Kumar R, Khadgawat R. Idiopathic juvenile osteoporosis in a child: a four-year follow-up with review of literature. J Pediatr Endocrinol

Metab. 2021;34(11):1487-90:10.1515/jpem-2021-0233.

183. Niederberger C. Re: Primary Osteoporosis in Men: An Unmet Medical Need. J Urol. 2020;203(5):866:10.1097/JU.0000000000000770.02.

184. Mendoza FA, Le Roux M, Ahmed I. Primary osteoporosis in men: an unmet medical need. Fertil Steril. 2019;112(5):791-8:10.1016/j.fertnstert.2019.10.003.

185. Bishop N. Primary osteoporosis. Endocr Dev. 2009;16:157-69:10.1159/000223694.

186. Janiszewska M, Kulik, T., Dziedzic, M., Żołnierczuk-Kieliszek, D., Barańska, A. Osteoporoza jako problem społeczny – patogeneza, objawyi czynniki ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej. Probl Hig Epidemiol 2015;96(107)

187. Varacallo M, Seaman TJ, Jandu JS, Pizzutillo P. Osteopenia. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.

188. Khosla S. Idiopathic osteoporosis--is the osteoblast to blame? J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(9):2792-4:10.1210/jcem.82.9.4264.

189. Ganesan K, Jandu JS, Anastasopoulou C, Ahsun S, Roane D. Secondary Osteoporosis. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.

190. Nayak N, Khedkar C, Khedkar C, Khedkar G. Osteoporosis. 2016. p. 181-5.

191. Bianchi ML. Causes of secondary pediatric osteoporosis. Pediatr Endocrinol Rev. 2013;10 Suppl 2:424-36

192. Cawthon PM. Gender differences in osteoporosis and fractures. Clin Orthop Relat Res. 2011;469(7):1900-5:10.1007/s11999-011-1780-7.

193. Farr JN, Khosla S. Skeletal changes through the lifespan--from growth to senescence. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(9):513-21:10.1038/nrendo.2015.89.

194. Gagnon C, Li V, Ebeling PR. Osteoporosis in men: its pathophysiology and the role of teriparatide in its treatment. Clinical Interventions in Aging. 2008;3(4):635-45:10.2147/cia.s3372.

195. Macdonald HM, Nishiyama KK, Kang J, Hanley DA, Boyd SK. Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: a population-based HR-pQCT study. J Bone Miner Res. 2011;26(1):50-62:10.1002/jbmr.171.

196. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, Oberg AL, McDaniel LJ, Holets M, et al. Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. J Bone Miner Res. 2006;21(1):124-31:10.1359/JBMR.050916.

197. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(1):10.1101/cshperspect.a031211.

198. Chanson P, Young J, Bry H. [Menopause and andropause]. Rev Prat. 2004;54(9):985-90

199. Blion C, Droupy S. [Menopause and andropause. Part Andropause]. Rev Prat. 2018;68(9):e373-e7

200. Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. Osteoporos Int. 2008;19(11):1517-25:10.1007/s00198-008-0609-z.

201. Kannegaard PN, van der Mark S, Eiken P, Abrahamsen B. Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comedications, comorbidity and survival. Age and Ageing. 2010;39(2):203-9:10.1093/ageing/afp221.

202. Rinonapoli G, Ruggiero C, Meccariello L, Bisaccia M, Ceccarini P, Caraffa A. Osteoporosis in Men: A Review of an Underestimated Bone Condition. Int J Mol Sci. 2021;22(4):10.3390/ijms22042105.

203. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. Lancet. 1999;353(9156):878-82:10.1016/S0140-6736(98)09075-8.

204. Williams S, Khan L, Licata AA. DXA and clinical challenges of fracture risk assessment in primary care. Cleve Clin J Med. 2021;88(11):615-22:10.3949/ccjm.88a.20199.

205. Chiang MH, Jang YC, Chen YP, Chan WP, Lin YC, Huang SW, Kuo YJ. T-score discordance between hip and lumbar spine: risk factors and clinical implications. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2023;15:1759720X231177147:10.1177/1759720X231177147.

206. Faulkner KG. The tale of the T-score: review and perspective. Osteoporos Int. 2005;16(4):347-52:10.1007/s00198-004-1779-y.

207. Dequeker J. Osteoporotic fractures, ageing, and the bone density T-score. Clin Rheumatol. 2000;19(3):171-3:10.1007/s100670050150.

208. Bjornsdottir S, Clarke BL, Mannstadt M, Langdahl BL. Male osteoporosis-what are the causes, diagnostic challenges, and management. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2022;36(3):101766:10.1016/j.berh.2022.101766.

209. Vescini F, Chiodini I, Falchetti A, Palermo A, Salcuni AS, Bonadonna S, et al. Management of Osteoporosis in Men: A Narrative Review. Int J Mol Sci. 2021;22(24):10.3390/ijms222413640.

210. Kaufman JM, Reginster JY, Boonen S, Brandi ML, Cooper C, Dere W, et al. Treatment of osteoporosis in men. Bone. 2013;53(1):134-44:10.1016/j.bone.2012.11.018.

211. Snyder PJ, Kopperdahl DL, Stephens-Shields AJ, Ellenberg SS, Cauley JA, Ensrud KE, et al. Effect of Testosterone Treatment on Volumetric Bone Density and Strength in Older Men With Low Testosterone: A Controlled Clinical Trial. JAMA Intern Med. 2017;177(4):471-9:10.1001/jamainternmed.2016.9539.

212. Cevikoi A, Umay E, Polat S, Ecerkale O, Cakci A. The relationship between bisphosphonate use and demographic characteristics of male osteoporosis patients. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(4):579-82:10.1590/s1807-59322011000400010.

213. de Paiva Goncalves V, Cabrera-Ortega AA, Carvalho JS, Ramadan D, Spolidorio LC. Physiological testosterone replacement effects on male aged rats with orchiectomy-induced osteoporosis in advanced stage: a tomographic and biomechanical pilot study. Aging Male. 2021;24(1):139-47:10.1080/13685538.2021.1990256.

214. Farahmand P, Spiegel R, Ringe JD. Male osteoporosis. Z Rheumatol. 2016;75(5):459-65:10.1007/s00393-016-0078-2.

215. Ishikawa K, Nagai T, Tsuchiya K, Oshita Y, Kuroda T, Ito H, et al. High bone turnover status as a risk factor in symptomatic hypocalcemia following denosumab treatment in a male patient with osteoporosis. Clin Interv Aging. 2018;13:1929-34:10.2147/CIA.S180614.

216. Kumar R, Mallya V, Mandal S, Tomar R, Khurana N, Maini L. Histopathological response to denosumab in giant cell tumours of bone - A review of 11 cases. J Cancer Res Ther. 2023;19(3):768-72:10.4103/jcrt.jcrt_1777_21.

217. Lewiecki EM, Blicharski T, Goemaere S, Lippuner K, Meisner PD, Miller PD, et al. A Phase III Randomized Placebo-Controlled Trial to Evaluate Efficacy and Safety of Romosozumab in Men With Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2018;103(9):3183-93:10.1210/jc.2017-02163.

218. Krupa K, Parmar M, Delo LF. Romosozumab. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.

219. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. N Engl J Med. 2016;375(16):1532-43:10.1056/NEJMoa1607948.

220. Yu S, Li D, Zhang N, Ni S, Sun M, Wang L, et al. Drug discovery of sclerostin inhibitors. Acta Pharm Sin B. 2022;12(5):2150-70:10.1016/j.apsb.2022.01.012.

221. Drake MT, Farr JN. Inhibitors of sclerostin: emerging concepts. Curr Opin

Rheumatol. 2014;26(4):447-52:10.1097/BOR.0000000000000073.

222. Radzki RP, Bieńko M, Filip R, Polak P, Michalska J. Bone losses in obese, ovariectomized rats appear to be independent from sclerostin-induced inhibition of the Wnt/β-catenin pathway. Ann Agric Environ Med. 2020;27(3):394-400:https://doi.org/10.26444/aaem/110527.

223. Miller PD, Hattersley G, Riis BJ, Williams GC, Lau E, Russo LA, et al. Effect of Abaloparatide vs Placebo on New Vertebral Fractures in Postmenopausal Women With Osteoporosis: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2016;316(7):722-33:10.1001/jama.2016.11136.

224. Uebelhart B, Ferrari S. [Osteoporosis]. Rev Med Suisse. 2017;13(544-545):88-90

225. Remport J, Blazovics A. Phytoestrogens in the treatment of menopause. Orv Hetil. 2017;158(32):1243-51:10.1556/650.2017.30805.

226. Zhang L, Li X, Ying T, Wang T, Fu F. The Use of Herbal Medicines for the Prevention of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:744647:10.3389/fendo.2021.744647.

227. Fu SW, Zeng GF, Zong SH, Zhang ZY, Zou B, Fang Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. Nutr Res. 2014;34(6):467-77:10.1016/j.nutres.2014.05.003.

228. Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. J Nat Sci Biol Med. 2011;2(2):154-63:10.4103/0976-9668.92322.

229. Martiniakova M, Babikova M, Omelka R. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. J Physiol Pharmacol. 2020;71(3):10.26402/jpp.2020.3.01.

230. Haffner-Luntzer M, Hankenson KD, Ignatius A, Pfeifer R, Khader BA, Hildebrand F, et al. Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. J Orthop Res. 2019;37(12):2491-8:10.1002/jor.24454.

231. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. Biomed Res Int. 2015;2015:635023:10.1155/2015/635023.

232. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone. 1995;17(4 Suppl):125S-33S:10.1016/8756-3282(95)00285-l.

233. Blouin S, Libouban H, Moreau MF, Chappard D. Orchidectomy models of

osteoporosis. Methods Mol Biol. 2008;455:125-34:10.1007/978-1-59745-104-8_9.

234. Cefalu CA. Is bone mineral density predictive of fracture risk reduction? Curr Med Res Opin. 2004;20(3):341-9:10.1185/030079903125003062.

235. Kanis JA, Johnell O, De Laet C, Johansson H, Oden A, Delmas P, et al. A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. Bone. 2004;35(2):375-82:10.1016/j.bone.2004.03.024.

236. Radzki RP, Bieńko M, Filip RS. Influence of strontium ranelate on mineral and mechanical properties of the femur in orchidectomized rats. Medycyna wet. 2007;63(12):1630-4

237. Moreau MF, Libouban H, Legrand E, Basle MF, Audran M, Chappard D. Lean, fat and bone masses are influenced by orchidectomy in the rat. A densitometric X-ray absorptiometric study. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001;1(3):209-13

238. Radzki RP, Bieńko M, Filip RS, Albera E, Kankofer M. Effect of strontium ranelate on femur densitometry and antioxidative/oxidative status in castrated male rats. Scand J Lab Anim Sci. 2009;36(2):193-201

239. Saki F, Kasaee SR, Sadeghian F, Talezadeh P, Ranjbar Omrani GH. The effect of testosterone itself and in combination with letrozole on bone mineral density in male rats. J Bone Miner Metab. 2019;37(4):668-75:10.1007/s00774-018-0972-6.

240. Finkelstein JS, Lee H, Leder BZ, Burnett-Bowie SA, Goldstein DW, Hahn CW, et al. Gonadal steroid-dependent effects on bone turnover and bone mineral density in men. J Clin Invest. 2016;126(3):1114-25:10.1172/JCI84137.

241. Golding PH. Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) to measure bone mineral density (BMD) for diagnosis of osteoporosis - experimental data from artificial vertebrae confirms significant dependence on bone size. Bone Rep. 2022;17:101607:10.1016/j.bonr.2022.101607.

242. Sebro R, Ashok SS. A Statistical Approach Regarding the Diagnosis of Osteoporosis and Osteopenia From DXA: Are We Underdiagnosing Osteoporosis? JBMR Plus. 2021;5(2):e10444:10.1002/jbm4.10444.

243. Gasser JA. Assessing bone quantity by pQCT. Bone. 1995;17(4 Suppl):145S-54S

244. Gasser JA. Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents. Methods Mol Med. 2003;80:323-41:10.1385/1-59259-366-6:323.

245. Yamauchi M, Sugishita T, Sugimoto T. [pQCT]. Nihon Rinsho. 2004;62 Suppl 2:290-4

246. Genant HK, Engelke K, Prevrhal S. Advanced CT bone imaging in osteoporosis. Rheumatology (Oxford). 2008;47 Suppl 4(Suppl 4):iv9-16:10.1093/rheumatology/ken180.

247. Schmidt C, Priemel M, Kohler T, Weusten A, Muller R, Amling M, Eckstein F. Precision and accuracy of peripheral quantitative computed tomography (pQCT) in the mouse skeleton compared with histology and microcomputed tomography (microCT). J Bone Miner Res. 2003;18(8):1486-96:10.1359/jbmr.2003.18.8.1486.

248. Radzki RP, Bienko M, Wolski D, Oniszczuk T, Radzka-Pogoda A, Polak P, et al. Lipoic acid (LA) dose-dependently protects bone losses in the mandible of rats during the development of osteopenia by inhibiting oxidative stress and promoting bone formation. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022;146:10.1016/j.biopha.2021.112467.

249. Horton JA, Murray GM, Spadaro JA, Margulies BS, Allen MJ, Damron TA. Precision and accuracy of DXA and pQCT for densitometry of the rat femur. J Clin Densitom. 2003;6(4):381-90:10.1385/jcd:6:4:381.

250. Hetherington-Rauth M, Bea JW, Blew RM, Funk JL, Lee VR, Roe DJ, et al. Relationship of cardiometabolic risk biomarkers with DXA and pQCT bone health outcomes in young girls. Bone. 2019;120:452-8:10.1016/j.bone.2018.12.013.

251. Yeh PS, Lee YW, Chang WH, Wang W, Wang JL, Liu SH, Chen RM. Biomechanical and tomographic differences in the microarchitecture and strength of trabecular and cortical bone in the early stage of male osteoporosis. PLoS One. 2019;14(8):e0219718:10.1371/journal.pone.0219718.

252. Moverare S, Venken K, Eriksson AL, Andersson N, Skrtic S, Wergedal J, et al. Differential effects on bone of estrogen receptor alpha and androgen receptor activation in orchidectomized adult male mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(23):13573-8:10.1073/pnas.2233084100.

253. Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R, Vanderschueren D. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. J Bone Miner Res. 2002;17(11):2080-6:10.1359/jbmr.2002.17.11.2080.

254. Nadia ME, I.I. N, M. N, N.S. A. An Evidence-Based Review of Micro-CT Assessments of the Postmenopausal Osteoporosis Rat Model. Int J Pharmacol. 2015;11(3):177-200:10.3923/ijp.2015.177.200.

255. Radzki RP, Bienko M, Filip R, Pierzynowski SG. The Protective and Therapeutic Effect of Exclusive and Combined Treatment with Alpha-ketoglutarate Sodium Salt and Ipriflavone on Bone Loss in Orchidectomized

Rats. J Nutr Health Aging. 2016;20(6):628-36:10.1007/s12603-015-0654-1.

256. Kim BT, Mosekilde L, Duan Y, Zhang XZ, Tornvig L, Thomsen JS, Seeman E. The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats. J Bone Miner Res. 2003;18(1):150-5:10.1359/jbmr.2003.18.1.150.

257. Iwamoto J, Takeda T, Yeh JK, Ichimura S, Toyama Y. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bones in orchidectomized young rats. Maturitas. 2003;44(1):19-27

258. Yao W, Jee WS, Chen J, Liu H, Tam CS, Cui L, et al. Making rats rise to erect bipedal stance for feeding partially prevented orchidectomy-induced bone loss and added bone to intact rats. JBone MinerRes. 2000/6;15(6):1158-68

259. Chin KY, Ima-Nirwana S. The effects of orchidectomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. Aging Male. 2015;18(1):60-6:10.3109/13685538.2014.954995.

260. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. Pueraria mirifica, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas. 2007;56(3):322-31

261. Ramli R, Khamis MF, Shuid AN. Bone Micro-CT Assessments in an Orchidectomised Rat Model Supplemented with Eurycoma longifolia. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:501858:10.1155/2012/501858.

262. Frost HM, Ferretti JL, Jee WS. Perspectives: some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanostat in skeletal physiology, disease, and research. Calcif Tissue Int. 1998;62(1):1-7:10.1007/s002239900384.

263. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int. 2015;2015:421746:10.1155/2015/421746.

264. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. Curr Osteoporos Rep. 2012;10(2):118-25:10.1007/s11914-012-0105-4.

265. Robling AG, Turner CH. Mechanical signaling for bone modeling and remodeling. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2009;19(4):319-38:10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i4.50.

266. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. Eur Cell Mater. 2012;24:278-91:10.22203/ecm.v024a20.

267. Crepaldi G, Romanato G, Tonin P, Maggi S. Osteoporosis and body composition. J Endocrinol Invest. 2007;30(6 Suppl):42-7

268. Cointry GR, Capozza RF, Ferretti SE, Meta MD, Feldman S, Capiglioni R, et al. Absorptiometric assessment of muscle-bone relationships in humans: reference, validation, and application studies. J Bone Miner Metab. 2005;23 Suppl:109-14:10.1007/BF03026334.

269. Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, et al. Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. Calcif Tissue Int. 2010;87(2):168-80:10.1007/s00223-010-9381-0.

270. Anthony TG. Mechanisms of protein balance in skeletal muscle. Domest Anim Endocrinol. 2016;56 Suppl(Suppl):S23-32:10.1016/j.domaniend.2016.02.012.

271. Koopman R, van Loon LJ. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. J Appl Physiol (1985). 2009;106(6):2040-8:10.1152/japplphysiol.91551.2008.

272. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. Am J Physiol. 1995;268(3 Pt 1):E514-20:10.1152/ajpendo.1995.268.3.E514.

273. Medina R, Wing SS, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. Biochem J. 1995;307 (Pt 3)(Pt 3):631-7:10.1042/bj3070631.

274. Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. J Appl Physiol (1985). 1990;68(1):1-12:10.1152/jappl.1990.68.1.1.

275. Zhong S, Lowe DA, Thompson LV. Effects of hindlimb unweighting and aging on rat semimembranosus muscle and myosin. J Appl Physiol (1985). 2006;101(3):873-80:10.1152/japplphysiol.00526.2005.

276. Serra C, Sandor NL, Jang H, Lee D, Toraldo G, Guarneri T, et al. The effects of testosterone deprivation and supplementation on proteasomal and autophagy activity in the skeletal muscle of the male mouse: differential effects on high-androgen responder and low-androgen responder muscle groups. Endocrinology. 2013;154(12):4594-606:10.1210/en.2013-1004.

277. Galvao DA, Spry NA, Taaffe DR, Newton RU, Stanley J, Shannon T, et al. Changes in muscle, fat and bone mass after 36 weeks of maximal androgen blockade for prostate cancer. BJU Int. 2008;102(1):44-7:10.1111/j.1464-410X.2008.07539.x.

278. Ferretti JL, Capozza RF, Cointry GR, Capiglioni R, Roldan EJ, Zanchetta JR. Densitometric and tomographic analyses of musculoskeletal interactions in humans. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2000;1(1):31-4

279. Hourde C, Jagerschmidt C, Clement-Lacroix P, Vignaud A, Ammann P, Butler-Browne GS, Ferry A. Androgen replacement therapy improves function in male

rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. Acta Physiol (Oxf). 2009;195(4):471-82:10.1111/j.1748-1716.2008.01902.x.

280. Wang L, Yin L, Zhao Y, Su Y, Sun W, Chen S, et al. Muscle Density, but Not Size, Correlates Well With Muscle Strength and Physical Performance. J Am Med Dir Assoc. 2021;22(4):751-9 e2:10.1016/j.jamda.2020.06.052.

281. Frank-Wilson AW, Johnston JD, Olszynski WP, Kontulainen SA. Measurement of muscle and fat in postmenopausal women: precision of previously reported pQCT imaging methods. Bone. 2015;75:49-54:10.1016/j.bone.2015.01.016.

282. Hanson ED, Betik AC, Timpani CA, Tarle J, Zhang X, Hayes A. Testosterone suppression does not exacerbate disuse atrophy and impairs muscle recovery that is not rescued by high protein. J Appl Physiol (1985). 2020;129(1):5-16:10.1152/japplphysiol.00752.2019.

283. Kajitani N, Takahashi J, Honda H, Hamahara J, Ando S. Severe Visceral Obesity, Fatty Liver and Diabetes after Orchiectomy for Prostate Cancer. Intern Med. 2020;59(18):2281-5:10.2169/internalmedicine.4653-20.

284. Gasparini SJ, Swarbrick MM, Kim S, Thai LJ, Henneicke H, Cavanagh LL, et al. Androgens sensitise mice to glucocorticoid-induced insulin resistance and fat accumulation. Diabetologia. 2019;62(8):1463-77:10.1007/s00125-019-4887-0.

285. Pouresmaeili F, Kamalidehghan B, Kamarehei M, Goh YM. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. Ther Clin Risk Manag. 2018;14:2029-49:10.2147/TCRM.S138000.

286. Deckard C, Walker A, Hill BJ. Using three-point bending to evaluate tibia bone strength in ovariectomized young mice. J Biol Phys. 2017;43(1):139-48:10.1007/s10867-016-9439-y.

287. Osuna LGG, Soares CJ, Vilela ABF, Irie MS, Versluis A, Soares PBF. Influence of bone defect position and span in 3-point bending tests: experimental and finite element analysis. Braz Oral Res. 2020;35:e001:10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0001.

288. Halbauer C, Schorler H, Liberto L, Capanni F. Comparison of a standardized four-point bending test to an implant system test of an osteosynthetic system under static and dynamic load condition. Biomed Tech (Berl). 2021;66(4):423-8:10.1515/bmt-2020-0228.

289. Bjora R, Falch JA, Staaland H, Nordsletten L, Gjengedal E. Osteoporosis in the Norwegian moose. Bone. 2001;29(1):70-3:10.1016/s8756-3282(01)00469-0.

290. Yurteri A, Yildirim A, Celik ZE, Vatansev H, Durmaz MS. The effect of quercetin on bone healing in an experimental rat model. Jt Dis Relat Surg. 2023;34(2):365-73:10.52312/jdrs.2023.870.

291. Wang Q, Telha W, Wu Y, Abotaleb B, Jiang N, Zhu S. Evaluation of the Properties of 3D-Printed Ti Alloy Plates: In Vivo and In Vitro Comparative Experimental Study. J Clin Med. 2023;12(2):10.3390/jcm12020444.

292. Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jamsa T, Vaananen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. Bone. 1994;15(5):523-32:10.1016/8756-3282(94)90276-3.

293. Schneider P, Reiners C, Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL. Bone quality parameters of the distal radius as assessed by pQCT in normal and fractured women. Osteoporos Int. 2001;12(8):639-46:10.1007/s001980170063.

294. Cointry GR, Ferretti JL, Reina PS, Nocciolino LM, Rittweger J, Capozza RF. The pQCT 'Bone Strength Indices' (BSIs, SSI). Relative mechanical impact and diagnostic value of the indicators of bone tissue and design quality employed in their calculation in healthy men and pre- and post-menopausal women. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2014;14(1):29-40

295. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF. Noninvasive analysis of bone mass, structure and strength. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2002. 145-61 p.

296. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Frost HM. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. Mech Ageing Dev. 2003;124(3):269-79:10.1016/s0047-6374(02)00194-x.

297. Bonjour JP, Kohrt W, Levasseur R, Warren M, Whiting S, Kraenzlin M. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. Nutr Res Rev. 2014;27(2):252-67:10.1017/S0954422414000183.

298. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. Clin Biochem Rev. 2005;26(4):97-122

299. Sakr HF, Ammar B, AlKharusi A, Al-Lawati I, AlKhateeb M, Elesawy BH. Resveratrol Modulates Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in A Rat Model of Male Hypogonadism. Chin J Integr Med. 2023;29(2):146-54:10.1007/s11655-022-2895-2.

300. Sun J, Pan Y, Li X, Wang L, Liu M, Tu P, et al. Quercetin Attenuates Osteoporosis in Orchiectomy Mice by Regulating Glucose and Lipid Metabolism via the GPRC6A/AMPK/mTOR Signaling Pathway. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:849544:10.3389/fendo.2022.849544.

301. Chen L, Wang G, Wang Q, Liu Q, Sun Q, Chen L. N-acetylcysteine prevents orchiectomy-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence. Am J Transl Res. 2019;11(7):4337-47

302. Fekete S, Simko J, Mzik M, Karesova I, Zivna H, Pavlikova L, Palicka V. Effect

of mirtazapine on rat bone tissue after orchidectomy. Pharmacology. 2015;95(3-4):166-72:10.1159/000380953.

303. Sakr HF, Hussein AM, Eid EA, Boudaka A, Lashin LS. Impact of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in a Rat Model of Male Hypogonadism. Vet Sci. 2020;7(4):10.3390/vetsci7040185.

304. Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejkovska K, Zivny P. Protective effect of amlodipine on rat bone tissue after orchidectomy. Pharmacology. 2012;89(1-2):37-43:10.1159/000335491.

305. Lefort M, Diaz Curiel M, Carrascal MT, Mendez-Davila C, de la Piedra C. Comparative effects of bicalutamide (Casodex) versus orchidectomy on bone mineral density, bone remodelling, and bone biomechanics in healthy rats. Urol Int. 2005;74(4):301-7:10.1159/000084427.

306. Zivna H, Gradosova I, Zivny P, Cermakova E, Palicka V. Effects of Amlodipine on Bone Metabolism in Orchidectomised Spontaneously Hypertensive Rats. Pharmacology. 2018;102(1-2):67-73:10.1159/000489666.

9. STRESZCZENIE

Osteoporoza będąca metaboliczną chorobą tkanki kostnej, manifestuje się niską masą kostną i zaburzoną mikroarchitekturą, co w konsekwencji znacząco zwiększa ryzyko złamań. Do niedawna uważano, iż dotyczy ona głównie kobiet, w szczególności w okresie pomenopauzalnym. Obecnie coraz częściej diagnozowana jest również u mężczyzn. Zarówno u kobiet, jak i mężczyzn zmiany zanikowe tkanki kostnej najczęściej warunkowane są zmniejszoną aktywnością hormonalną gonad, ale ich charakter i przebieg są odmienne. W przeciwieństwie do estrogenów u kobiet, poziom androgenów u mężczyzn maleje wolniej. Proces ten ulega przyspieszeniu dopiero po 65-70 roku życia, co powoduje, że zmiany zanikowe tkanki kostnej u mężczyzn zazwyczaj pojawiają się później. Jednak powikłania wynikające ze złamań osteoporotycznych skutkują większą śmiertelnością mężczyzn. Trudności niosą ze sobą również diagnostyka i leczenie osteoporozy u mężczyzn. Wciąż nie istnieje baza danych pomiarów densytometrycznych dużej populacji męskiej, co wymusza konieczność wyliczanie wartości T-score i Z-score w oparciu bazę pomiarów stworzoną dla kobiet. Dodatkowo część leków antyosteoporotycznych, mających dopuszczenie do stosowania u kobiet, ze względu na brak dopuszczenia nie mogą być stosowane u mężczyzn. Mimo wdrażania wciąż nowych terapii osteoporozy u mężczyzn, zauważalny jest również wzrost zainteresowania medycyną tradycyjną i poszukiwaniem alternatywnych metod zapobiegania i leczenia osteopatii metabolicznych. Taką alternatywą może być wykorzystanie fitozwiązków. Wśród nich wyróżniają się fitoestrogeny, których działanie osteoprotekcyjne jest dobrze udokumentowane oraz znacznie mniej poznane fitoandrogeny. Bogatym źródłem fitoandrogenów, a także DHEA jest pyłek sosnowy, stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej od tysięcy lat. Współczesne badania dowiodły, że wykazuje on działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe,

przeciwutleniające, oraz przeciwzapalne. Dlatego celem podjętych badań było określenie osteotropowego wpływu różnych dawek pyłku sosnowego, podawanego *p.o*. na metabolizm tkanki kostnej w warunkach rozwoju zmian zanikowych kości samców szczurów poddanych orchidektomii. Uwzględniając znaczenie układu mięśniowego dla prawidłowego funkcjonowania kośćca oraz intensyfikację procesów katabolicznych mięśni po gonadektomii, równolegle podjęto badania nad wpływem różnych dawek pyłku sosnowego na powierzchnię oraz gęstość mięśni podudzia, a także kumulację w nich tkanki tłuszczowej.

W doświadczeniu użyto samców szczurów szczepu Wistar – 40 sztuk, z których 8 osobników poddano pozornej gonadektomii (SHO), a u pozostałych wykonano zabieg orchidektomii (ORX). Samce ORX zostały podzielone losowo na 4 grupy (n=8). Po siedmiodniowej rekonwalescencji grupa samców SHO oraz jedna grupa samców ORX otrzymywały płyn fizjologiczny pozostałe grupy ORX otrzymywały odpowiednio testosteron (7mg/kg m.c./7 dni s.c.) i pyłek sosnowy w dwóch dawkach (50 i 150 mg/kg m.c./24h *p.o*.). Po upływie 60 dni zwierzęta poddano eutanazji, a następnie lewe kości piszczelowe wyizolowano i oczyszczono z tkanek miękkich. Prawe kończyny miednicze oddzielone zostały od tułowia w stawie biodrowym w całości wraz ze skórą i mięśniami. Do badań biochemicznych zabezpieczone zostało również osocze krwi. Przy użyciu metody desytometrycznej (DXA) przeprowadzona została analiza całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych. Z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT) w bliższej części przynasadowej określone zostały parametry densytometryczne i strukturalne tkanki kostnej gąbczastej kości piszczelowych. W połowie długości trzonu badanych kości oceniane były ww. parametry tkanki kostnej zbitej, a także cechy geometryczne trzonu. Za pomocą pQCT określona została również przewidywana wytrzymałość mechaniczna kości.

Struktura i rozmieszczenie beleczek kostnych tkanki kostnej gąbczastej podlegała również ocenie z użyciem mikrotomografii komputerowej (μ-CT). Wykorzystując metodę trójpunktowego testu ugięcia określona została rzeczywista wytrzymałość mechaniczna kości piszczelowych w zakresie pomiaru siły maksymalnej, modułu elastyczności Younga oraz wykonanej pracy do granicy sprężystości. Metodą pQCT przeprowadzone zostały również pomiary powierzchni przekroju poprzecznego mięśni (mCSA), gęstości mięśni (MD), powierzchni tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej (IMAT) oraz tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT). Określone zostały również stężenia biochemicznych wskaźników metabolizmu tkanki kostnej (CTX-I, OC, bALP).

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą osteoprotekcyjnego wpływu pyłku sosnowego, zależnie od zastosowanej dawki. Użycie u szczurów z rozwijającymi się zmianami zanikowymi tkanki kostnej dawki 150 mg/kg m.c całkowicie hamowało zmiany zanikowe kości wywołane brakiem wpływu hormonów gonadalnych. Zależność taka wykazana została zarówno w obrębie tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej. Również podawanie orchidektomizowanym szczurom dawki 50 mg/kg m.c. zaznaczyło się ochronnym wpływem na kości. Był on jednak słabiej wyrażony i dotyczył wyłącznie tkanki kostnej gąbczastej. Wyższa dawka pyłku sosnowego hamowała kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, czego wyrazem było utrzymanie ich gęstości i wielkości powierzchni na poziomie grupy operowanej rzekomo i grupy otrzymującej testosteron. Odnotowany został również jego ograniczający wpływ na kumulację śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej. Na podkreślenie zasługuje fakt osteoprotekcyjnej skuteczności pyłku sosnowego, szczególnie podawanego w większych dawkach, co dowodzi możliwości jego wykorzystania w profilaktyce rozwoju osteoporozy u mężczyzn, jak i samców innych gatunków zwierząt.

10. ABSTRACT

Osteoporosis, a metabolic bone disease, is characterised by low bone mass and disturbed microarchitecture, significantly increasing the risk of fractures. Until recently, it was believed to affect mainly women, especially during their postmenopausal period. Nowadays, it is increasingly diagnosed in men as well. In both women and men, bone tissue atrophy changes are most often caused by reduced gonadal hormone activity, but their nature and course differ. Unlike estrogen levels in women, androgen levels in men decline more slowly. This process accelerates only after the age of 65-70, resulting in bone tissue atrophy changes appearing later in men. However, complications resulting from osteoporotic fractures lead to higher mortality in men. Diagnosis and treatment of osteoporosis in men also present challenges. There is still no database of densitometric measurements for a large male population, necessitating the calculation of T-score and Z-score values based on measurements made for women. Additionally, some anti-osteoporotic drugs approved for use in women cannot be used in men due to lack of approval. Despite the implementation of new osteoporosis therapies in men, there is also a noticeable increase in interest in traditional medicine and the search for alternative methods of preventing and treating metabolic bone diseases. An alternative approach may involve the use of phytochemicals. Among them, phytoestrogens stand out, whose osteoprotective effects are well-documented, as well as less-known phytoandrogens. Pine pollen, used in traditional Chinese medicine for thousands of years, is a rich source of phytoandrogens and DHEA. Modern research has shown that it exhibits immunomodulatory, anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory effects. Therefore, the aim of the undertaken research was to determine the osteotropic effect of various doses of pine pollen, administered orally, on bone tissue metabolism in male rat models of orchidectomy-induced bone atrophy. Considering the importance of the

muscular system for proper skeletal function and the intensification of muscle catabolic processes after gonadectomy, parallel studies were also conducted on the effect of various doses of pine pollen on the surface and density of leg muscles, as well as the accumulation of fat tissue in them.

In the experiment, male Wistar rats were used - 40 individuals, out of which 8 individuals underwent sham gonadectomy (SHO), while the remaining underwent orchidectomy (ORX). The ORX males were randomly divided into 4 groups (n=8). After a seven-day recovery period, the SHO group and one ORX group received saline solution, while the remaining ORX groups received testosterone (7mg/kg b.w./7 days s.c.) and pine pollen at two doses (50 and 150 mg/kg b.w./24h p.o.) respectively. After 60 days, the animals were euthanized, and the left tibiae were isolated and cleaned of soft tissues. The right pelvic limbs were separated from the trunk at the hip joint, along with the skin and muscles. Blood plasma was also collected for biochemical analysis. The analysis of the entire skeleton and isolated tibiae was conducted using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) method. Densitometric and structural parameters of the trabecular bone tissue of the proximal tibia were determined using peripheral quantitative computed tomography (pQCT). At the midshaft of the examined bones, the above-mentioned parameters of cortical bone tissue, as well as geometric features of the shaft, were assessed. The expected mechanical strength of the bones was also determined using pQCT. The structure and distribution of trabecular bone beams of the trabecular bone tissue were also evaluated using micro-computed tomography (μCT). Using the three-point bending test method, the actual mechanical strength of the tibiae was determined in terms of maximum force measurement, Young's modulus of elasticity, and work done to the elastic limit. Measurements of muscle cross-sectional area (mCSA), muscle density (MD), intramuscular adipose tissue (IMAT), and

subcutaneous adipose tissue (SAT) were also conducted using the pQCT method. Additionally, concentrations of biochemical markers of bone tissue metabolism (CTX-I, OC, bALP) were determined.

The results of the conducted studies demonstrate the osteoprotective effect of pine pollen, depending on its dosage. The use of a dose of 150 mg/kg b.w. in rats with developing bone atrophy completely inhibited the atrophic changes in bones induced by the lack of gonadal hormone influence. This dependency was observed both in cortical and trabecular bone tissue. Similarly, administering a dose of 50 mg/kg b.w. to orchidectomized rats showed a protective effect on bones. However, it was less pronounced and only affected the trabecular bone tissue. A higher dose of pine pollen inhibited the catabolic effect of orchidectomy on the femoral muscles, as evidenced by maintaining their density and surface area at the level of the supposedly operated group and the group receiving testosterone. Its limiting effect on the accumulation of intramuscular and subcutaneous adipose tissue was also noted. It is worth emphasizing the osteoprotective efficacy of pine pollen, especially when administered in larger doses, which demonstrates its potential for usage in the prevention of osteoporosis development in men and males of other animal species.

Zał. Nr 2

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 16.04.2024 Podpis promotora .....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych
  z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 16.04.2024 r. Podpis autora .....

* niepotrzebne skreślić