

ВЛИЯНИЕ МАГНИЯ ОРОТАТА НА ОБМЕН КОЛЛАГЕНА И СОДЕРЖАНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС СО СТЕРОИДНЫМ ОСТЕОПОРОЗОМ

Н.В. Савинова

к.м.н., ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России (Республика Удмуртия, г. Ижевск)
E-mail: biochem2017@mail.ru

О.В. Данилова

к.м.н., ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России (Республика Удмуртия, г. Ижевск)

Н.Г. Наумова

к.м.н., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (Республика Удмуртия, г. Ижевск)

С.Е. Переведенцева

к.м.н., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (Республика Удмуртия, г. Ижевск)

С.Р. Трофимова

к.б.н., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (Республика Удмуртия, г. Ижевск)

Цель исследования – оценить эффективность воздействия препарата «Магнерот» на обмен коллагена и минеральную составляющую костной ткани крыс с глюкокортикоидным остеопорозом. **Материал и методы.** Препарат «Магнерот» вводили внутривенно животным со стероидным остеопорозом в течение 10 дней. В диафизе бедренной кости и теле 2-го поясничного позвонка крыс определяли количество суммарного коллагена, нейтрально-солеорастворимого коллагена и свободного гидроксипролина колориметрическим методом. Содержание кальция, магния и фосфора в костной ткани и плазме крови определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. **Результаты.** В костной ткани животных с остеопорозом, получавшим «Магнерот», наблюдалось повышение концентрации нейтрально-солеорастворимого коллагена, снижение уровня свободного гидроксипролина, а также увеличение содержания суммарного коллагена и компонентов минеральной фазы (кальция, фосфора, магния). **Выводы.** Введение препарата «Магнерот» животным с глюкокортикоидным остеопорозом способствует активации синтеза и угнетению распада коллагена, а также корректирует изменения в содержании минеральных компонентов в костной ткани. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования препарата «Магнерот» в комплексной терапии остеопороза с целью оптимизации ремоделирования костной ткани.

Ключевые слова: остеопороз, глюкокортикоиды, коллаген, минеральный матрикс, оротат магния.

Для цитирования: Савинова Н.В., Данилова О.В., Наумова Н.Г., Переведенцева С.Е., Трофимова С.Р. Влияние магния оротата на обмен коллагена и содержание минеральных компонентов в костной ткани крыс со стероидным остеопорозом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(11):49–54. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-08>

В современной медицине для терапии ряда заболеваний используют глюкокортикоидные препараты, наиболее частым побочным эффектом применения которых является развитие вторичного остеопороза [1]. При этом происходит быстрая потеря костной массы и повышение вероятности переломов уже в ранние сроки после начала глюкокортикоидной терапии у лиц любого возраста и пола. Наиболее часто остеопоротические изменения развиваются в поясничном отделе позвоночника и в проксимальной части бедренной кости [1].

В комплексной терапии остеопороза используются препараты, содержащие магний, который оказывает как прямое, так и опосредованное действие на метаболизм и свойства костной ткани.

Более высокую биодоступность имеют органические соли магния [2].

Одним из таких препаратов является «Магнерот». Входящая в его состав оротовая кислота способствует всасыванию магния в желудочно-кишечном тракте и сокращает потери этого катиона с мочой [2]. За счет оротовой кислоты в тканях усиливаются пластические процессы. Поэтому актуальным является изучение возможного протективного эффекта магния оротата на остеопоротические изменения.

Ц е л ь р а б о т ы – оценка эффективности воздействия препарата «Магнерот» на обмен коллагена и минеральную составляющую костной ткани крыс с глюкокортикоидным остеопорозом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 32 белых нелинейных крысах-самцах с массой тела 180–220 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к корму и воде. При проведении опытов соблюдались биоэтические нормы гуманного обращения с животными, изложенные в Хельсинской декларации, в «Положении об использовании животных в биомедицинских исследованиях» (1989 г.).

Животные были разделены на три группы. У крыс первой группы ($n=8$) моделировали развитие стероидного остеопороза путем ежедневного введения преднизолона («Рихтер», Венгрия) в дозе 50 мг/кг массы тела крысы в течение 14 дней [3]. Вторую группу ($n=8$) составили животные со стероидным остеопорозом, которые получали препарат «Магнерот» («Wörwag Pharma», Германия) – комбинированный препарат, в составе одной таблетки 500 мг магния оротата. Животным один раз в день на протяжении 10 дней вводили «Магнерот» из расчета 50 мг/кг массы тела, что соответствует терапевтической дозе препарата. Для получения необходимой дозы таблетку препарата «Магнерот» растирали и растворяли в 9,5 мл стерильной дистиллированной воды, полученный 5%-ный раствор вводили в объеме 0,2 мл. Контрольная группа крыс ($n=16$), ежедневно получала 0,9%-ный раствор NaCl в объеме 1 мл/100 г массы тела. Все препараты вводили животным внутривентрально.

По окончании эксперимента исследовали показатели обмена коллагена и содержание минеральных компонентов в теле 2-го поясничного позвонка (преобладает губчатая костная ткань) и в верхней трети диафиза бедренной кости (преобладает компактная костная ткань), а также определяли концентрацию общего кальция, фосфора и магния в плазме крови.

Состояние обмена костного коллагена оценивали по содержанию суммарного коллагена (СК) [4], нейтрально-солеорастворимой фракции коллагена (НРК) [5], а также свободного гидроксипролина (СО) [4]. На преобладание анаболических процессов указывает увеличение содержания СК, а также НРК (недавно синтезированные молекулы тропоколлагена, не содержащие интермолекулярные связи). Известно, что катаболические процессы приводят к повышению содержания СО и снижению СК в тканях.

Содержание кальция, фосфора и магния в теле 2-го поясничного позвонка и верхней трети диафиза бедренной кости, а также в плазме крови определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Подготовку проб костной ткани для исследования проводили согласно методическим указаниям МУК 4.1.1482-03 [6]. Для этого навеску костной ткани (10 мг) обезжиривали в смеси ацетона и 96%-ного этилового спирта в соотношении 1:1 в течение 15 мин, три раза промывали деионизованной водой, высушивали при комнатной температуре. Затем навеску помещали в цилиндр из фторопласта, добавляли 1 мл 70%-ной азотной кислоты, пробу гидролизуют при температуре 115 °С в течение 60 мин. Гидролизат переносят в мерную полипропиленовую пробирку, доводят деионизованной водой до 10 мл. Исследование показателей выполнено на спектрометре «Spectro flame modulas» (США) в ФГБУН УдмФИЦ УрО РАН ИЦ МФМ (г. Ижевск).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6.1 фирмы StatSoft. В группах выборки определяли медиану и межквартильный размах (25%; 75%). Достоверность различий между экспериментальными и контрольной группами оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия между показателями считали статистически значимыми при уровне достоверности $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении преднизолона животным первой группы наблюдались изменения, как в обмене коллагена, так и в содержании минеральной фазы костной ткани. В исследуемых тканях животных с глюкокортикоидным остеопорозом по сравнению с контролем отмечалось угнетение синтетических реакций в обмене коллагена, о чем свидетельствует пониженный уровень НРК, а также активация процессов распада коллагена, приводящих к увеличению СО (таблица).

Вследствие сдвигов в метаболизме костного коллагена у животных первой группы наблюдалось уменьшение СК в позвонке на 17,35% ($p=0,000778$) и в бедренной кости на 13,9% ($p=0,040570$). Таким образом, в исследуемых тканях животных со стероидным остеопорозом отмечались однонаправленные изменения в обмене коллагена, свидетельствующие о преобладании катаболических процессов.

Таблица. Показатели обмена коллагена в позвонке и бедренной кости крыс со стероидным остеопорозом и при введении препарата «Магнерот» животным с остеопорозом

Показатель	Контроль	Стероидный остеопороз	Стероид. остеопороз + магния оротат
НРК, ммоль/кг	<u>4,01 (3,76; 4,51)</u> 3,81 (3,72; 4,77)	<u>2,51 (2,38; 3,01)**</u> 3,24 (2,96; 3,62)**	<u>5,26 (4,76; 5,89)*</u> 4,77 (4,77; 5,34)*
СО, ммоль/кг	<u>1,88 (1,50; 2,26)</u> 1,33 (1,05; 1,43)	<u>3,75 (3,38; 4,76)**</u> 2,01 (1,81; 2,38)**	<u>2,51 (2,01; 2,51)*</u> 1,72 (1,43; 2,10)*
СК, ммоль/кг	<u>212,23 (194,69; 254,32)</u> 177,30 (148,71; 198,28)	<u>175,40 (154,35; 212,23)***</u> 152,52 (133,45; 163,96)*	<u>238,54 (221,0; 247,66)</u> 200,18 (175,40; 242,13)

Примечание: в числителе – показатели обмена коллагена в теле 2-го поясничного позвонка, в знаменателе – показатели обмена коллагена диафиза бедренной кости; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой.

Воздействие глюкокортикоидных гормонов на состояние обмена коллагена связано с их влиянием на костные клетки. В условиях избытка глюкокортикоидов снижается продукция остеобластов вследствие увеличения синтеза антагонистов передачи сигналов Wnt/ β -катенин [1], а также отмечается угнетение синтеза коллагена I типа в результате подавления экспрессии соответствующего гена. Глюкокортикоиды активируют костную резорбцию путем снижения продукции остеопротегерина (ингибитора остеокластогенеза) и повышения выработки RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), увеличивающего дифференцировку предшественников остеокластов и стимулирующего резорбтивную функцию зрелых остеокластов [1].

Интенсификацию костной деструкции в условиях избытка глюкокортикоидных гормонов также связывают с формированием вторичного гиперпаратиреоза, который является следствием развития транзиторной гипокальциемии, вызванной снижением абсорбции кальция в кишечнике и в почках [1]. Так, в плазме крови крыс со стероид-

ным остеопорозом концентрация общего кальция была понижена до 2,0 (1,98; 2,19) ммоль/л ($p=0,008652$) против 2,44 (2,32; 2,6) ммоль/л в контроле. Кроме того, при гиперкортицизме увеличивается экскреция почками фосфатов и магния [7], что приводит к гипофосфатемии и гипомagneзиемии. В наших исследованиях в плазме крови животных со стероидным остеопорозом концентрация неорганического фосфата составила 1,05 (1,02; 1,08) ммоль/л, магния – 0,72 (0,66; 0,81) ммоль/л, что на 4,6% ($p=0,018130$) и 15,3% ($p=0,023949$) соответственно ниже данных показателей контрольной группы.

Активация резорбтивных процессов в костной ткани животных, получавших преднизолон, привела к снижению содержания в ней минеральных компонентов. Так, в позвонке (рис. 1) уменьшалась концентрация кальция на 10,68% ($p=0,003276$), фосфора на 6,12% ($p=0,046000$), магния на 8,34% ($p=0,000778$).

Аналогичную направленность имели изменения в содержании минеральных компонентов в бедренной кости (рис. 2).

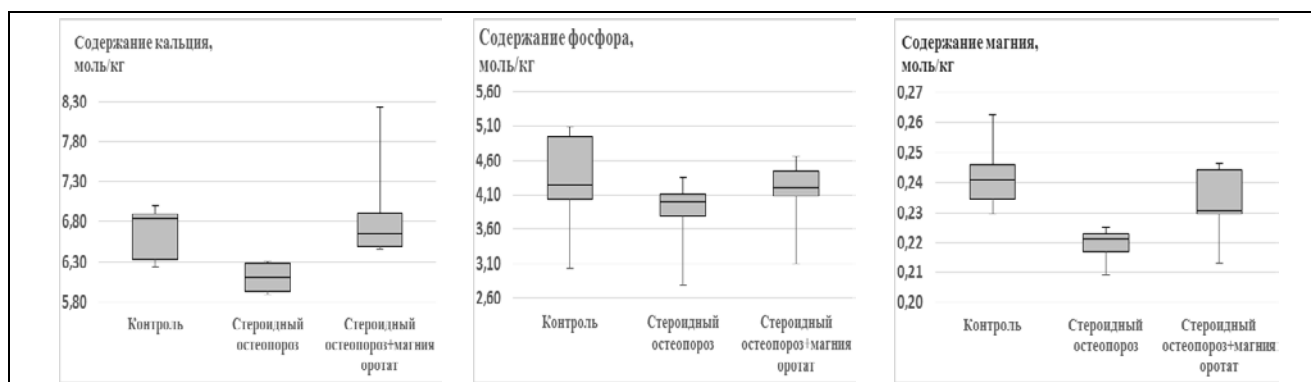


Рис. 1. Содержание минеральных компонентов в позвонке крыс со стероидным остеопорозом и при введении препарата «Магнерот» животным с остеопорозом

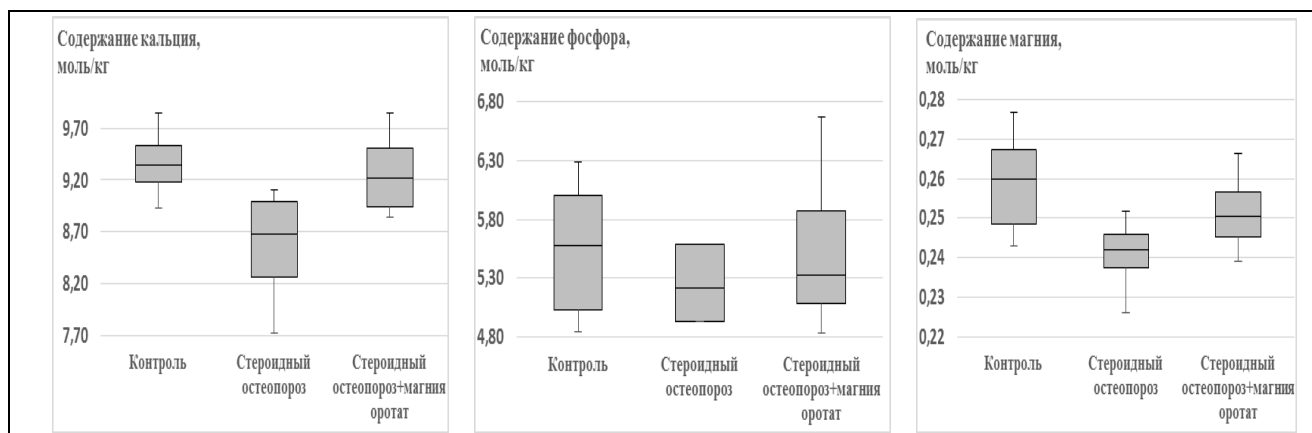


Рис. 2. Содержание минеральных компонентов в бедренной кости крыс со стероидным остеопорозом и при введении препарата «Магнерот» животным с остеопорозом

При остеопорозе, наряду с базовой терапией (бисфосфонаты, терипаратид, деносумаб, комбинированные препараты витамина Д и кальция), используют препараты, содержащие органические соли магния. Высокой кишечной абсорбцией обладает магния оротат, который является действующим веществом препарата «Магнерот». В костной ткани он проникает через цитоплазматическую мембрану остеобластов и в клеточных структурах диссоциирует на ионы [8]. При введении препарата «Магнерот» животным со стероидным остеопорозом в обмене костного коллагена (см. таблицу) отмечался высокий уровень анаболической активности по сравнению с контролем и с животными первой группы. Об этом свидетельствует увеличение НРК в гомогенатах позвонка и бедренной кости соответственно на 31,17% ($p=0,011719$) и 25,2% ($p=0,040570$) по сравнению с данными контрольной группы, а также на 109,56% ($p=0,000939$) и 47,22% ($p=0,000778$) по сравнению с показателями животных с глюкокортикоиндуцированным остеопорозом. Полученные результаты, вероятно, связаны с анаболическим эффектом как оротовой кислоты – предшественника пиримидиновых нуклеотидов, которые входят в состав нуклеиновых кислот, участвующих в синтезе молекул коллагена, так и ионов магния, являющихся кофактором ДНК- и РНК-полимераз, а также стабилизирующих структуру транспортной РНК. Также ионы магния увеличивают пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, индуцируют остеогенную дифференцировку [9].

Показатель распада коллагена – СО увеличился в костной ткани крыс второй эксперимен-

тальной группы по сравнению с контролем на 33,51% ($p=0,046000$) в позвонке и на 29,32% ($p=0,046000$) в бедренной кости. Полученные данные позволяют предположить, что изменения в обмене коллагена связаны с ингибирующим воздействием магния на лизилоксидазу – фермент, катализирующий образование ковалентных межмолекулярных связей в коллагеновой микрофибрилле [10]. Это создает условия большей доступности «молодого» коллагена для металлопротеиназ, повышается скорость его деградации. Однако по сравнению с уровнем СО в костной ткани животных с индуцированным остеопорозом, у крыс второй экспериментальной группы данный показатель был ниже, наиболее значительно в позвонке – на 33,07% ($p=0,002762$). Вероятно, под воздействием ионов магния происходит снижение интенсивности процессов распада коллагена вследствие уменьшения дифференцировки преостеокластов, ограничения пролиферации остеокластов [11], снижения активности матриксных металлопротеиназ [10]. Необходимо указать, что в обмене коллагена животных второй экспериментальной группы процессы синтеза и распада были уравновешены, поэтому содержание СК в изучаемых тканях не отличалось от данных контроля. Вместе с тем сравнение показателей обмена коллагена первой и второй экспериментальных групп позволяет говорить о том, что при введении препарата «Магнерот» крысам со стероидным остеопорозом, в обмене костного коллагена преобладали анаболические процессы, в результате которых содержание СК было выше на 36,0% ($p=0,000778$) в позвонке и на 12,9% ($p=0,005385$) в бедренной кости по срав-

нению с животными с глюкокортикоидиндуцированным остеопорозом.

Введение препарата «Магнерот» животным с экзогенным гиперкортицизмом нивелировало изменения концентрации макроэлементов в плазме крови, а также в костной ткани. Так, содержание компонентов минерализованного матрикса костной ткани позвонка и бедренной кости крыс второй экспериментальной группы не отличалось от данных контроля (см. рис. 1 и 2), но было выше по сравнению с количеством изучаемых макроэлементов в костной ткани крыс со стероидным остеопорозом. Возможно, полученные данные связаны с участием ионов магния в процессе гидроксилирования холекальциферола [11]. Образовавшийся кальцитриол увеличивает ренальную абсорбцию и всасывание в кишечнике кальция и фосфора. Кроме того, магний необходим и для процесса минерализации костной ткани, так как активирует щелочную фосфатазу, а также является кофактором многих ферментов энергетического метаболизма.

ВЫВОДЫ

Введение препарата «Магнерот» животным с глюкокортикоидным остеопорозом способствует активации синтеза и угнетению распада коллагена, а также корригирует изменения в содержании минеральных компонентов (кальция, магния, фосфора) в костной ткани. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования препарата «Магнерот» в комплексной терапии остеопороза с целью оптимизации ремоделирования костной ткани.

Авторы выражают благодарность д.ф.м.н., профессору О.М. Канунниковой (ФГБУН УдмФИЦ УрО РАН НЦ МФМ, г. Ижевск) за организацию исследования содержания минеральных компонентов в костной ткани и плазме крови методом атомно-эмиссионной спектроскопии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Торопцова Н.В.* Глюкокортикоидный остеопороз: диагностика, профилактика и лечение // Научно-практическая ревматология. 2014; 4: 423–429.
2. *Громова О.А., Торшин И.Ю., Юргель И.С.* Ретроспектива фармакокинетических исследований магниевых препаратов // Трудный пациент. 2009; 6: 44–8.
3. *Зиганишина Л. Е., Бурнашева З. А., Валеева И. Х.* Сравнительное изучение эффективности димефосфона и ксидифона при стероидном остеопорозе у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000; 6: 39–42.
4. *Шараев П.Н., Бутолин Е.Г., Иванов В.Г.* Показатели обмена биополимеров соединительной ткани при многократном стрессе // Украинский биохимический журнал. 1987; 3: 85.
5. *Прошина Л.Я., Приваленко М.Н.* Исследование фракционного состава коллагена в ткани печени // Вопросы медицинской химии. 1982; 1: 115–119.
6. *Иванов С.И., Подунова Л.Г., В.Б.Скачков В.Б., Тутельян В.А., Скальный А.В., Демидов В.А., Скальная М.Г., Серебрянский Е.П., Грабеклис А.Р., Кузнецов В.В.* Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, поливитаминных препаратах с микроэлементами, в биологически активных добавках к пище и в сырье для их изготовления методом атомной эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной аргоновой плазмой: Методические указания (МУК 4.1.1482-03). М.: Федеральный Центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. 2003; 56 с.
7. *Blaine J., Chonchol M., Levi M.* Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis // Clin J Am Soc Nephrol. 2015; 10:1257–1272
8. *Muhammad V. M., Singh R., Malhotra R.* Mineral transporters – the novel approach in management of bone health and osteoporosis // Orthopedics today. 2010; 12: 1–6.
9. *He L.Y., Zhang X.M., Liu B.* et al. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity // Braz J Med Biol Res. 2016; 49: 52–57.
10. *Торшин И.Ю., Громова О.А.* Дисплазии соединительной ткани, клеточная биология и молекулярные механизмы воздействия магния // Русский медицинский журнал. 2008; 4:230–238.
11. *Rude R.K., Singer F.R., Gruber H.E.* Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency // J. Am. Coll. Nutr. 2009; 28:131–141.

Поступила 31 июля 2019 г.

EFFICIENCY OF MAGNESIUM OROTATE ON COLLAGEN EXCHANGE AND CONTENT OF MINERAL COMPONENTS IN BONE TISSUE OF RATS WITH STEROID OSTEOPOROSIS

© Authors, 2019

N.V. Savinova

Ph.D. (Med.), Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk)

E-mail: biochem2017@mail.ru

O.V. Danilova

Ph.D. (Med.), Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk)

N.G. Naumova

Ph.D. (Med.), Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk)

S.E. Perevedentseva

Ph.D. (Med.), Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk)

S.R. Trofimova

Ph.D. (Biol.), Izhevsk State Medical Academy (Izhevsk)

The aim of the study. To evaluate the efficiency of Magnerot medication on the collagen exchange and the mineral component of bone tissue in rats with glucocorticoid osteoporosis. **Materials and Methods.** Magnerot was being introduced intragastrically to the animals with steroid osteoporosis for 10 days. The amount of total collagen, neutral salt soluble collagen and free hydroxyproline in the diaphysis of the femur and the body of the second lumbar vertebra of rats were determined by colorimetry. Calcium, magnesium and phosphorus content in the bone tissue and blood plasma was revealed by atomic emission spectroscopy with inductively bound plasma. **Results.** In the bone tissue of animals with osteoporosis which received Magnerot were noted: elevation of concentration of neutral salt soluble collagen, reduction of the level of free hydroxyproline and increase of the content of total collagen and the components of mineral phase (calcium, phosphorus, magnesium). **Conclusion.** Administration of Magnerot to animals with glucocorticoid osteoporosis promotes the activation of synthesis and inhibition of collagen decay, as well as corrects the changes in the content of mineral components in the bone tissue. The results of our research testify to promising use of Magnerot as a part of complex therapy of osteoporosis to promote remodulation of bone tissue.

Key words: *osteoporosis, glucocorticoids, collagen, mineral matrix, magnesium orotate.*

For citation: Savinova N.V., Danilova O.V., Naumova N.G., Perevedentseva S.E., Trofimova S.R. Efficiency of magnesium orotate on collagen exchange and content of mineral components in bone tissue of rats with steroid osteoporosis. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(11):49–54. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-08>

REFERENCES

1. Toropcova N.V. Glijukokortikoidnyj osteoporoz: diagnostika, profilaktika i lechenie // Nauchno-prakticheskaja revmatologija. 2014; 4: 423–429.
2. Gromova O.A., Torshin I.Ju., Jurgel' I.S. Retrospektiva farmakokineticheskikh issledovanij magnievych preparatov // Trudnyj pacient. 2009; 6: 44–8.
3. Ziganshina L.E., Burnasheva Z.A., Valeeva I.H. Sravnitel'noe izuchenie jeffektivnosti dimefosfona i ksidofona pri steroidnom osteoporozе u kryс // Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija. 2000; 6: 39–42.
4. Sharaev P.N., Butolin E.G., Ivanov V.G. Pokazateli obmena biopolimerov soedinitel'noj tkani pri mnogo–kratnom stresse // Ukrainskij biohimicheskij zhurnal. 1987; 3: 85.
5. Proshina L.Ja., Privalenko M.N. Issledovanie frakcionnogo sostava kollagena v tkani pečeni // Voprosy medicinskoj himii. 1982; 1: 115–119.
6. Ivanov S.I., Podunova L.G., V.B. Skachkov V.B., Tutel'jan V.A., Skal'nyj A.V., Demidov V.A., Skal'naja M.G., Serebrjanskij E.P., Grabeklis A.R., Kuznecov V.V. Opreделение soderzhaniya himicheskikh jelementov v diagnostiruemyh biosubstratah, polivitaminnyh preparatah s mikrojelementami, v biologicheski aktivnyh dobavkah k pishhe i v syr'e dlja ih izgotovlenija metodom atomnoj jemissionnoj spektrometrii s induktivno svjazannojoj argonovoj plazmoj: Metodicheskie ukazanija (MUK 4.1.1482-03). M.: Federal'nyj Centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii. 2003; 56 s.
7. Blaine J., Chonchol M., Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis // Clin J Am Soc Nephrol. 2015; 10:1257–1272
8. Muhammad V. M., Singh R., Malhotra R. Mineral transporters – the novel approach in management of bone health and osteoporosis // Orthopedics today. 2010; 12: 1–6.
9. He L.Y., Zhang X.M., Liu B. et al. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity // Braz J Med Biol Res. 2016; 49: 52-7.
10. Torshin I.Ju., Gromova O.A. Displazii soedinitel'noj tkani, kletohnaja biologija i molekularnyje mehanizmy vozdejstvija magnija // Russkij medicinskij zhurnal. 2008; 4:230–238.
11. Rude R.K., Singer F.R., Gruber H.E. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency // J. Am. Coll. Nutr. 2009; 28:131–141.