



Клинова С.В.¹, Минигалиева И.А.¹, Проценко Ю.Л.², Сутункова М.П.¹,
Рябова Ю.В.¹, Герцен О.П.², Набиев С.Р.², Балакин А.А.², Лукин О.Н.², Лисин Р.В.²,
Кузнецов Д.А.², Привалова Л.И.¹, Панов В.Г.^{1,3}, Чернышов И.Н.¹, Кацнельсон Л.Б.²,
Никитина Л.В.², Кацнельсон Б.А.¹

Анализ изменений сердечно-сосудистой системы крыс при действии свинцовой интоксикации и мышечной нагрузки

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620014, Екатеринбург, Россия;

²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», 620049, Екатеринбург, Россия;

³ФГБУН «Институт промышленной экологии Уральского отделения Российской академии наук», 620219, Екатеринбург, Россия

Введение. Одним из факторов риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний является загрязнение производственной и окружающей среды некоторыми токсичными металлами, среди которых особое значение придается свинцу. Экспозиция организма к вредным веществам в производственных условиях часто сочетается с мышечной работой различной степени тяжести, однако влияние этого сочетания на развитие патологических процессов, связанных вредной экспозицией, изучено недостаточно.

Материалы и методы. Субхронический эксперимент продолжительностью 6 нед был проведен на белых беспородных крысах-самцах. Интоксикация моделировалась путём повторных внутривенных инъекций 3-водного ацетата свинца 3 раза в неделю. Для моделирования мышечной нагрузки выбран бег со скоростью 25 м/мин в течение 10 мин 5 дней в неделю. Выполнены биохимические и электрокардиографические исследования, регистрировались параметры артериального давления. На изолированных многоклеточных препаратах миокарда правого желудочка изучали сократимость в изометрическом и физиологическом режимах сокращения. Методом электрофореза в полиакриламидном геле определяли соотношение тяжёлых цепей миозина. С помощью *in vitro* motility assay измеряли скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину.

Результаты. Физическая нагрузка при свинцовой интоксикации нормализовала уровень кальция и активность ангиотензин-превращающего фермента в сыворотке крови, а также вольтаж изоэлектрической линии и амплитуду зубца Т на электрокардиограмме. Показано увеличение уровня креатининкиназы-МВ при сочетанном действии свинца и физической нагрузки. Влияние физической нагрузки при свинцовой интоксикации на сократимость миокарда неоднозначно: нормализовалась максимальная скорость изотонического укорочения в трабекулах, но в большей степени, чем при свинцовой интоксикации, снизилась максимальная скорость развития силы в изометрическом режиме в папиллярных мышцах. Частично нормализовалась максимальная скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину и соотношение тяжёлых цепей миозина.

Заключение. В целом использованная мышечная нагрузка ослабляет проявления кардиотоксического действия свинца.

Ключевые слова: Рв; мышечная нагрузка; сердечно-сосудистая система; сократимость; препараты миокарда; миозин

Для цитирования: Клинова С.В., Минигалиева И.А., Проценко Ю.Л., Сутункова М.П., Рябова Ю.В., Герцен О.П., Набиев С.Р., Балакин А.А., Лукин О.Н., Лисин Р.В., Кузнецов Д.А., Привалова Л.И., Панов В.Г., Чернышов И.Н., Кацнельсон Л.Б., Никитина Л.В., Кацнельсон Б.А. Анализ изменений сердечно-сосудистой системы крыс при действии свинцовой интоксикации и мышечной нагрузки. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(12): 1467-1474. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1467-1474>

Для корреспонденции: Клинова Светлана Владиславовна, науч. сотр. ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 620014, Екатеринбург. E-mail: klinova.svetlana@gmail.com

Участие авторов: Клинова С.В. – сбор данных литературы, сбор и обработка материала, написание текста; Минигалиева И.А., Проценко Ю.Л., Никитина Л.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Сутункова М.П., Привалова Л.И. – концепция и дизайн исследования; Рябова Ю.В. – сбор данных литературы, сбор и обработка материала; Герцен О.П. – сбор и обработка материала, написание текста; Набиев С.Р., Балакин А.А., Лукин О.Н., Лисин Р.В., Кузнецов Д.А., Чернышов И.Н. – сбор и обработка материала; Панов В.Г. – статистическая и математическая обработка; Кацнельсон Л.Б. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Заключение локального этического комитета ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора: содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными The Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012). Исследования были одобрены Локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол № 8 от 08.11.2018 г.).

Поступила: 04.10.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликована: 30.12.2021

Svetlana V. Klinova¹, Ilzira A. Minigalieva¹, Yuri L. Protsenko², Marina P. Sutunkova¹, Iuliia V. Ryabova¹, Oksana P. Gerzen², Salavat R. Nabiev², Alexander A. Balakin², Oleg N. Lookin², Ruslan V. Lisin², Daniil A. Kuznetsov², Larisa I. Privalova¹, Vladimir G. Panov^{1,3}, Ivan N. Chernyshov¹, Leonid B. Katsnelson², Larisa V. Nikitina², Boris A. Katsnelson¹

Analysis of changes in the rat cardiovascular system under the action of lead intoxication and muscular exercise

¹Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation;

²Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049, Russian Federation;

³Institute of Industrial Ecology, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620219, Russian Federation

Introduction. One of the risk factors for cardiovascular diseases is the toxic metal pollution of the industrial area and the environment. Lead is the most critical of toxic metals. In industrial conditions, the body's exposure to harmful substances is often combined with muscular work of varying severity. It has not been studied enough how these combinations influence the development of pathological processes associated with harmful exposure.

Materials and methods. The subchronic experiment was carried out on white outbred male rats for six weeks. Intoxication was simulated by repeated intraperitoneal injections of lead acetate three times a week. Running was chosen to model the muscle exercise at a 25 m/min speed for 10 minutes 5 days a week. We performed biochemical and electrocardiographic studies. Blood pressure parameters were recorded. Muscle contractility was studied on isolated multicellular preparations of the right ventricular myocardium in isometric and physiological contraction modes. The ratio of myosin heavy chains was determined by the polyacrylamide gel electrophoresis. The sliding velocity of reconstituted thin filaments on myosin using an *in vitro* motility assay.

Results. Physical exercise under lead intoxication normalized the level of calcium and the angiotensin-converting enzyme activity in the blood serum, the voltage of the isoelectric line and the amplitude of the T wave on the electrocardiogram. The combined action of lead and physical exercise showed an increase in the creatinine kinase-MB level. We found that the effect of exercise under lead intoxication on myocardial contractility was ambiguous. The maximum isotonic shortening velocity in trabeculae was normalized, but the maximum rate of strength development in the isometric mode in the papillary muscles decreased to a greater extent than under lead intoxication. The maximum sliding velocity of reconstituted thin filaments and myosin and the heavy chain ratio was partly normalized.

Conclusion. In general, muscle exercise attenuated the lead cardiotoxic effects.

Keywords: Pb; running; cardiovascular system; contractility; isolated heart muscles; myosin

For citation: Klinova S.V., Minigalieva I.A., Protsenko Yu.L., Sutunkova M.P., Ryabova Iu.V., Gerzen O.P., Nabiev S.R., Balakin A.A., Lookin O.N., Lisin R.V., Kuznetsov D.A., Privalova L.I., Panov V.G., Chernyshov I.N., Katsnelson L.B., Nikitina L.V., Katsnelson B.A. Analysis of the rat cardiovascular system changes under lead intoxication and muscular exercise. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(12): 1467-1474. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1467-1474> (In Russ.)

For correspondence: Svetlana V. Klinova, researcher, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers of Rospotrebnadzor, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: klinova.svetlana@gmail.com

Information about the authors:

Klinova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-0927-4062>
Protsenko Yu.L., <https://orcid.org/0000-0002-4693-244X>
Ryabova Iu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>
Nabiev S.R., <https://orcid.org/0000-0001-9095-6775>
Lookin O.N., <https://orcid.org/0000-0001-9544-1885>
Kuznetsov D.A., <https://orcid.org/0000-0003-4519-3291>
Panov V.G., <https://orcid.org/0000-0001-6718-3217>
Katsnelson L.B., <https://orcid.org/0000-0001-9553-9110>
Katsnelson B.A., <https://orcid.org/0000-0001-8750-9624>

Minigalieva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>
Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>
Gerzen O.P., <https://orcid.org/0000-0003-3853-1571>
Balakin A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7712-6686>
Lisin R.V., <https://orcid.org/0000-0001-6861-4816>
Privalova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1442-6737>
Chernyshov I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2018-5386>
Nikitina L.V., <https://orcid.org/0000-0002-7174-2357>

Contribution: Klinova S.V. – collection of literature data, collection and processing of material, writing a text; Minigalieva I.A., Protsenko Yu.L., Nikitina L.V. – the concept and design of the study, editing; Sutunkova M.P., Privalova L.I. – the concept and design of the study; Ryabova Iu.V. – collection of literature data, collection and processing of material; Gerzen O.P. – collection of literature data, writing a text; Nabiev S.R., Balakin A.A., Lookin O.N., Lisin R.V., Kuznetsov D.A., Chernyshov I.N. – collection and processing of material; Panov V.G. – statistical and mathematical processing; Katsnelson L.B. – the concept and design of the study, writing a text, editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Conclusion of the Local Ethics Committee of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being: Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing: keeping, feeding, caring for animals and removing them from the experiment was carried out in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki and “International guiding principles for biomedical research involving animals” developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012). The studies were approved by the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing (protocol No. 8 of 08.11.2018).

Received: October 19, 2021 / Accepted: November, 2021 / Published: December 30, 2021

Введение

Экспозиция организма к вредным веществам, связанная с условиями труда (особенно в горно-металлургическом производстве), как правило, сочетается с мышечной работой большей или меньшей тяжести, однако влияние этого сочетания на развитие патологических процессов, связанных с той или иной вредной экспозицией, изучено недостаточно.

Источниками загрязнения окружающей среды свинцом помимо горнодобывающей и металлургической промышленности служат свинцово-кислотные аккумуляторы, краски, керамика и другие предметы быта [1, 2]. Несмотря на снижение загрязнения окружающей среды свинцом в последние десятилетия [2, 3], проблема хронического отравления им до сих пор актуальна. В ряде эпидемиологических исследований показано повышение рисков развития сердечно-сосудистых заболеваний при воздействии свинца [4–8]. По оценкам Института измерения показателей и оценки здоровья (ИИПОЗ), в 2017 г. во всём мире с долгосрочным пагубным воздействием свинца на организм было связано 1,06 млн случаев смерти. Кроме того, по оценкам ИИПОЗ, в 2016 г. воздействием свинца было обусловлено 10,3% глобального бремени патологий сердца, вызванных гипертонией, 5,6% глобального бремени ишемической болезни сердца и 6,2% глобального бремени инсульта [9].

Обнаружено, что тренирующая мышечная нагрузка спортсменов может повысить резистентность организма к свинцовой и некоторым другим металлоинтоксикациям [10, 11]. Roshan и соавт. [12] и Shahandeh и соавт. [13] показали, что регулярные упражнения на беговой дорожке могут значительно снизить другие токсические эффекты свинца, например, нейротоксичность, а также уменьшить окислительный стресс у крыс, подвергшихся воздействию ацетата свинца, в то время как бег до истощения не был связан с этими полезными эффектами.

Цель работы – исследование влияния умеренной физической нагрузки на состояние сердечно-сосудистой системы у крыс при субхронической свинцовой интоксикации.

Материалы и методы

Экспериментальная модель и токсикологические показатели. Исследование было проведено на аутбредных крысах-самцах собственного разведения. Масса тела животных на начало исследования составляла около 250 г, возраст – 3,5–4 мес. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012). Исследования были одобрены Локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол № 8 от 8.11.2018 г.).

В каждую из 4 исследуемых групп отбиралось случайным образом от 10 до 15 животных. 1-я группа животных подвергалась воздействию ацетата свинца («Pb»), 2-я – мышечной нагрузки («Бег»), 3-я – воздействию двух этих факторов («Pb + Бег»), 4-я являлась контрольной («Контроль»). В течение 6 нед 3 раза в неделю интраперитонеально животным соответствующих групп вводился раствор 3-водного ацетата свинца в разовой дозе 11 мг/кг массы тела. Животные в группах «Бег» и «Контроль» получали физраствор в объёме 2 мл. Моделирование физической нагрузки выполняли с использованием беговой дорожки для крыс «TSE Treadmill System GmbH» (TSE Systems International Group, Германия). Перед началом исследования крыс обучали бегу на тредмиле: ежедневно в течение 5 дней осуществлялся 5-минутный ознакомительный бег с отключённой электростимуляционной площадкой со скоростью 8 м/мин. Далее в течение 3 нед беговая нагрузка возрастала от 8 до 22 м/мин (с шагом 3 м/мин) при длительности 10 мин в день 5 дней в неделю. Затем парал-

лельно с инъекциями животные бегали 10 мин в день 5 дней в неделю на скорости 25 м/мин в течение 6 нед.

На 5-й неделе интраперитонеальных введений у животных была выполнена неинвазивная регистрация электрокардиограммы (система ecgTUNNEL, етма TECHNOLOGIES, Париж, Франция) и артериального давления (CODA-HT8, Kent Scientific, Торрингтон, США). По окончании эксперимента гематологические показатели у крыс, включая уровень гемоглобина, определяли с помощью гематологического анализатора «Methic 18». Подсчёт ретикулоцитов выполняли рутинным способом. Оценили следующие показатели сыворотки крови: кальций, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эндотелин-1, активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и креатининкиназа-МВ (КК-МВ). В суточной моче крыс биохимически определяли содержание копропорфиринов.

Изучение сократимости изолированных сердечных мышц. Перед умерщвлением методом цервикальной дислокации животным всех групп вводили гепарин (1000 МЕ, 0,25 мл на животное). Сердце вырезали сразу после эвтаназии и помещали на 15 мин в физиологический раствор Кребса–Хенселейта с 2,3-бутандионом моноксимом (30 мМ). Тонкие трабекулы и папиллярные мышцы иссекали из правого желудочка тех же сердец животных, из которых извлекали миозин. Препараты фиксировали к штокам сервомотора длины и датчика силы, помещали в терморегулируемую ванну (Muscle Research System, Scientific Instruments GmbH, Германия). Регистрацию сокращений изолированных препаратов миокарда в изометрическом и физиологическом режимах проводили, как описано ранее [19, 20].

Для сопоставления результатов полученные значения силы нормировали на площадь поперечного сечения препаратов, а амплитуду укорочения – на величину длины препарата при заданной преднагрузке (95% от максимальной длины (0,95 L_{max})). Значение максимальной скорости укорочения нормировали на длину препарата. По результатам, полученным в серии регистраций при разных уровнях преднагрузки, строили кривые зависимости «сила-скорость». Регистрация механической активности препаратов в физиологическом режиме нагрузок позволила построить графики в координатах «сила-укорочение», которые являются аналогами петель «давление-объём» для целостного сердца [21]. Производимую мышцами работу оценивали по площади этих графиков при разных преднагрузках.

Определение соотношения α - и β -тяжёлых цепей миозина (ТЦМ) в сердце и оценка скорости актин-миозинового взаимодействия. В миокарде правого желудочка крыс методом денатурирующего гель-электрофореза определяли соотношение между изоформами тяжёлых цепей миозина (α - и β -ТЦМ). Гели окрашивали кумасси, промывали водой, сканировали с помощью денситометра GS-800 (BioRad, США) и определяли процентное соотношение α - и β -ТЦМ в пробе.

Движение актиновых нитей относительно миозиновых определяет укорочение мышц в соответствии с теорией скользящих нитей, выдвинутой Huxley и Niedergerke в 1954 г. *In vitro* motility assay позволяет изучать скорость скольжения тонких филаментов по миозину. Из правых желудочков сердец животных всех экспериментальных групп был выделен миозин. По поверхности, покрытой им, в присутствии АТФ и кальция в растворе ($pCa = 4$) двигались флуоресцентно окрашенные реконструированные тонкие филаменты. Тонкие нити были реконструированы из актина, тропонина и тропомиозина смешением этих белков, полученных из разных видов животных [14], что является широко распространённой практикой [15, 16]. Их соотношение в тонких нитях проверялось в 10% SDS-ПААГ [17].

Анализ в *in vitro* motility assay проводили, как описано ранее [14]. Все эксперименты выполняли при температуре 32 °С. Флуоресцентные меченые тонкие нити визуализировали с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Axiovert 200, оснащённого объективом 100x/1,45 Oil alpha Plan-Fluar (Carl Zeiss) и камерой EMCCD

Таблица 1 / Table 1

Биохимические и электрокардиографические показатели состояния крыс по окончании эксперимента
Biochemical and electrocardiographic indices of rats at the end of the experiment

Показатель Indices	Группа крыс / Groups of rats			
	Контроль / Control	Pb	Бег / Running	Pb + Бег / Pb + Running
Биохимические показатели сыворотки крови / Biochemical indices in blood serum				
Ca, ммоль/л (mmol/L)	2.487 ± 0.042	2.353 ± 0.029*	2.368 ± 0.031*	2.388 ± 0.028
КК-МВ, Е/л (СК-МВ, U/L)	1,337.13 ± 123.30	1,358.82 ± 105.66	1,398.46 ± 106.53	1,750.23 ± 122.78*■●
АПФ, Е/л (АСЕ, U/L)	143.00 ± 14.74	236.36 ± 21.95*	166.64 ± 13.44■	135.91 ± 15.22■
VEGF, 10 ⁶ Е/мл (10 ⁶ U/mL)	5.67 ± 0.40	5.13 ± 0.31	8.10 ± 0.74*■	12.58 ± 1.68*■●
Показатели электрокардиограммы во 2-м отведении / ECG 2 lead indices				
Изоэлектрическая линия, мВ (Isoelectric line, mV)	-0.06082 ± 0.00091	-0.0713 ± 0.0025*	-0.0596 ± 0.0032#	-0.0635 ± 0.0051
Амплитуда Т, мВ (T amplitude, mV)	0.1250 ± 0.0028	0.1506 ± 0.0074*	0.138 ± 0.011	0.136 ± 0.011

Примечание. Здесь и в табл. 2: различия статистически значимы при $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента: * – от контроля; ■ – от группы «Pb»; ● – от группы «Бег».

Note. Differences are statistically significant for $p < 0.05$ by Student's t -test: * – from the control; ■ – from the Pb group; ● – from the Running group.

iXon-897BV (Andor Technology). В каждой исследуемой проточной камере регистрировали 10 полей по 30 с. Данные анализировали с использованием программного обеспечения GMinPro [18]. Были измерены скорости для > 100 отдельных филаментов при определении средней скорости и её стандартной ошибки для каждого животного.

Математическая обработка и анализ данных. Статистическую значимость межгрупповых различий средних значений всех полученных показателей оценивали с помощью t -критерия Стьюдента с поправкой на множественные сравнения (ANOVA). Биомеханические данные обрабатывали с использованием непараметрического U -критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Для математического описания комбинированной токсичности была использована методология построения поверхности отклика (the Response Surface Methodology – RSM), обобщающая методы ANOVA и математической теории организации эксперимента [22].

Результаты

Влияние мышечной нагрузки на развитие свинцовой интоксикации. Из числа оценённых показателей состояния организма крыс статистически значимые неблагоприятные сдвиги в сравнении с контролем были отмечены по 33,5% показателей. К их числу относятся такие специфичные для свинцовой интоксикации сдвиги по сравнению с контролем, как увеличение содержания копропорфиринов в моче (в 3,3 раза; $p < 0,05$), увеличение процентного соотношения ретикулоцитов в периферической крови (в 3,2 раза; $p < 0,05$), снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците (в 1,4 раза; $p < 0,05$).

Бег на тредмиле при заданных параметрах переносился большинством животных безотказно, что позволяет считать этот бег моделью умеренной мышечной нагрузки. Её влияние на развитие интоксикации свинцом оказалось неоднозначным: в 23,7% показателей вредный эффект свинца усилен, в 28,9% – ослаблен, в 47,4% фактически не изменился.

Биохимические и системные физиологические показатели, характеризующие состояние сердца и сосудов. В результате проведённых исследований отмечено снижение уровня кальция в сыворотке крови в группах «Pb» и «Бег» (табл. 1). При совместном влиянии свинца и мышечной нагрузки уровень кальция приближается к контрольной величине. Наблюдали статистически значимое увеличение креатининкиназы-МВ (КК-МВ) в группе «Pb + Бег». Мышечные упражнения

приводили к увеличению фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) при свинцовой интоксикации даже больше, чем сами по себе.

Обнаружено увеличение активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) при свинцовой интоксикации (см. табл. 1).

На электрокардиограмме обнаружено снижение изоэлектрической линии при свинцовой интоксикации, которое оказалось частично нивелировано при свинцовой интоксикации на фоне физической нагрузки. Также при свинцовой интоксикации обнаружено увеличение амплитуды зубца Т, в то время как на фоне физической нагрузки такого увеличения не обнаружено.

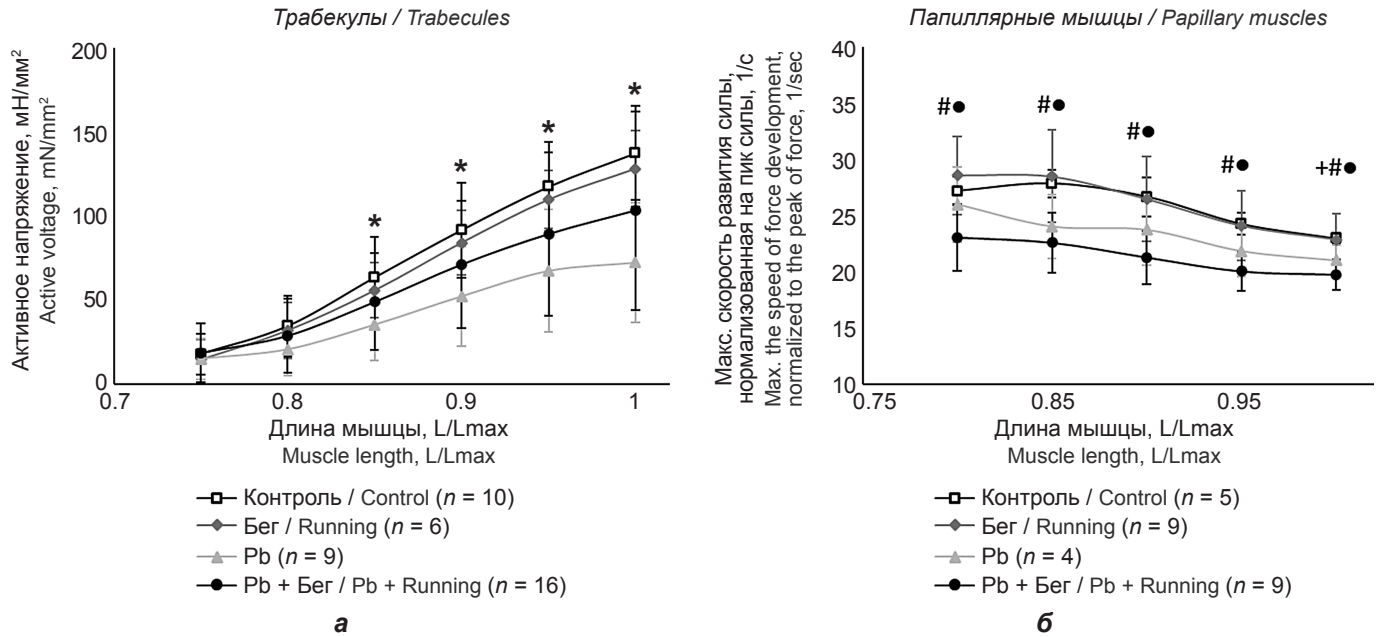
Сократимость изолированных препаратов миокарда. Наблюдала отрицательный инотропный эффект свинца в трабекулах – снижение величины активного напряжения (рис. 1, а). Отрицательный инотропный эффект свинцовой интоксикации частично нивелировался на фоне мышечной нагрузки.

Нормализованная максимальная скорость развития напряжения в изометрическом режиме сокращения (рис. 1, б) снижалась при сочетанном воздействии свинца и физической нагрузки в обоих типах мышц. Тенденцию к снижению нагрузки при изолированной свинцовой экспозиции, хотя она и не достигала значимости. Физическая нагрузка по данному показателю усугубляла токсическое действие свинца. Снижалась нормализованная скорость расслабления при воздействии свинца как самого по себе, так и в сочетании с физической нагрузкой (статистически значимо в трабекулах). При этом только физическая нагрузка сама по себе слегка увеличивала данный показатель.

Наблюдала рост временных показателей сокращения (время достижения пика силы) и расслабления (время расслабления до 50% от максимальной амплитуды) препаратов миокарда (статистически значимый в препаратах трабекул) крыс, подверженных свинцовой интоксикации, независимо от наличия мышечной нагрузки (рис. 2, а). Наличие физической нагрузки при свинцовой интоксикации не влияло на скоростные и временные характеристики изометрических сокращений по сравнению с одной свинцовой экспозицией. Сама по себе нагрузка если и оказывала влияние на скоростные и временные показатели изометрического сокращения трабекул и папиллярных мышц, то оно было противоположным свинцу.

Свинцовая экспозиция снижала максимальную скорость развития изотонического укорочения в трабекулах (рис. 2, б). На фоне мышечной нагрузки происходила нормализация этого показателя в обоих типах мышц.

Original article

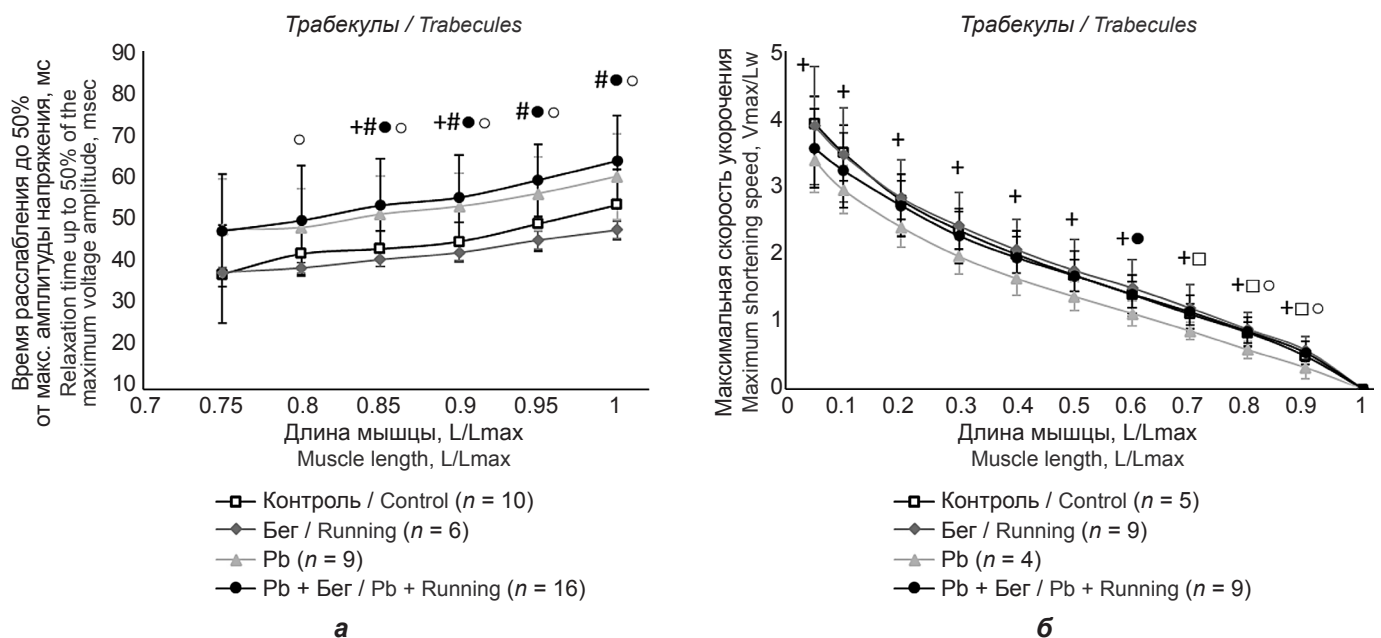


Статистически значимые различия между группами: * – «Pb» и «Контроль»; # – «Pb + Бег» и «Контроль»; ● – «Pb + Бег» и «Бег». There are significant differences: * – Pb vs Control; # – Pb + Running vs Control; ● – Pb + Running vs Running.

Рис. 1. Сило-скоростные параметры изометрического сокращения изолированных препаратов мышц сердца: а – активное напряжение; б – нормированная максимальная скорость развития силы. Длина мышцы приведена в долях от Lmax.

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Fig. 1. The isometric contraction force-rate parameters of isolated heart muscle preparations: a – active tension; б – the maximal normalized rate. Data are shown as mean ± S.D.



Статистически значимые различия между группами: + – «Pb» и «Контроль»; # – «Pb + Бег» и «Контроль»; ● – «Pb + Бег» и «Бег»; ○ – «Pb» и «Бег».

There are significant differences: + – Pb vs Control; # – Pb + Running vs Control; ● – Pb + Running vs Running; ○ – Pb vs Running.

Рис. 2. Некоторые параметры сократимости мышечных препаратов: а – время расслабления до уровня 50% амплитуды изометрических сокращений при разных величинах растяжения препаратов; б – максимальная скорость изотонического укорочения.

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Fig. 2. Some parameters of muscle contractions: a – the time of relaxation to 50% isometric contraction amplitude at different stretching of preparations; б – the maximal isotonic shortening velocity.

Data are shown as mean ± S.D.

Миозин. Максимальная скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину (V_{max}) правого желудочка крыс с интоксикацией свинцом значительно снижалась (табл. 2). При мышечной нагрузке у крыс V_{max} не отличалась от таковой в контрольной группе. Однако при воздействии мышечной нагрузки на фоне свинцовой интоксикации V_{max} повышается относительно группы «Pb», но не достигает значений в группах «Контроль» и «Бег», то есть при наличии мышечной нагрузки ослабляется проявление свинцовой интоксикации по показателю V_{max} . Все изменения скорости скольжения реконструированного тонкого филамента по миозину коррелировали с изменениями соотношения α - и β -тяжёлых цепей миозина (см. табл. 2).

Анализ сочетанного действия с помощью RSM. При RSM-анализе наблюдали сложную картину сочетанного действия свинца и мышечной нагрузки по показателям сердечно-сосудистой системы. Физическая нагрузка ослабляла токсическое действие свинца по уровню кальция в крови на высоких уровнях воздействия (рис. 3, а). По другим биохимическим показателям наблюдали сложную картину сочетанного действия, при которой ведущим фактором является физическая нагрузка, но при высоких концентрациях свинца обнаруживалось аддитивное действие.

Интоксикация свинцом ослаблялась на фоне мышечной нагрузки, например, по длительности интервала QT и вольтажу изоэлектрической линии во втором отведении (противонаправленное действие). Также по некоторым электрокардиографическим показателям наблюдали сложную картину сочетанного действия (например, амплитуда зубца Т во втором отведении, рис. 3, б). По большинству гемодинамических показателей обнаружено противонаправленное действие свинца и мышечной нагрузки.

Влияние свинцовой интоксикации на активное напряжение ослабляется физической нагрузкой: наблюдали переход от однофакторного действия свинца при его низких дозах до противонаправленного при высоких (рис. 3, в). В папиллярных мышцах, наоборот, видим противонаправленное действие, которое переходит в однофакторное действие свинца при $L = 0,95-1 Lmax$ и высоких дозах свинца (рис. 3, г).

Физическая нагрузка ослабляла влияние свинцовой интоксикации на скоростные параметры изометрического

Таблица 2 / Table 2

Максимальная скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по миозину правого желудочка и соотношение α - и β -тяжёлых цепей миозина (ТЦМ)

Maximal rate of reconstituted thin filament sliding over right ventricle myosin and the ratio of α - and β -myosin heavy chains (МНС)

Показатель Indices	Группы крыс Groups of rats			
	Контроль Control	Pb	Бег Running	Pb + Бег Pb + Running
V_{max} , МКМ/с V_{max} , $\mu\text{m/s}$	6.19 ± 0.16	4.70 ± 0.10*	6.26 ± 0.17■	5.77 ± 0.16*■●
α -ТЦМ, % α -МНС, %	85 ± 5	53 ± 4*	82 ± 3■	68 ± 4*■●
β -ТЦМ, % β -МНС, %	15 ± 5	47 ± 4*	18 ± 3■	32 ± 4*■●

сокращения. Наблюдали аддитивность при сочетании высоких «доз» свинца и физической нагрузки по показателю «скорость развития напряжения» и противонаправленное по показателю «скорость расслабления». Для временных показателей ведущим фактором оставалась свинцовая интоксикация – превалирует однофакторное влияние свинца.

Токсическое действие свинца на скорость изотонического укорочения было ослаблено при физической нагрузке. В трабекулах наблюдали противонаправленное действие этих факторов, в папиллярных мышцах – сложную картину, которая меняется от однофакторного действия свинца до однофакторного действия мышечной нагрузки.

В целом изобольный анализ не выявил показателей, где физическая нагрузка явно усиливала бы влияние свинцовой интоксикации на показатели сердечно-сосудистой системы, хотя в некоторых сочетаниях доз при сложной картине сочетанного действия по части показателей мы наблюдали синергизм (см. рис. 3, б).

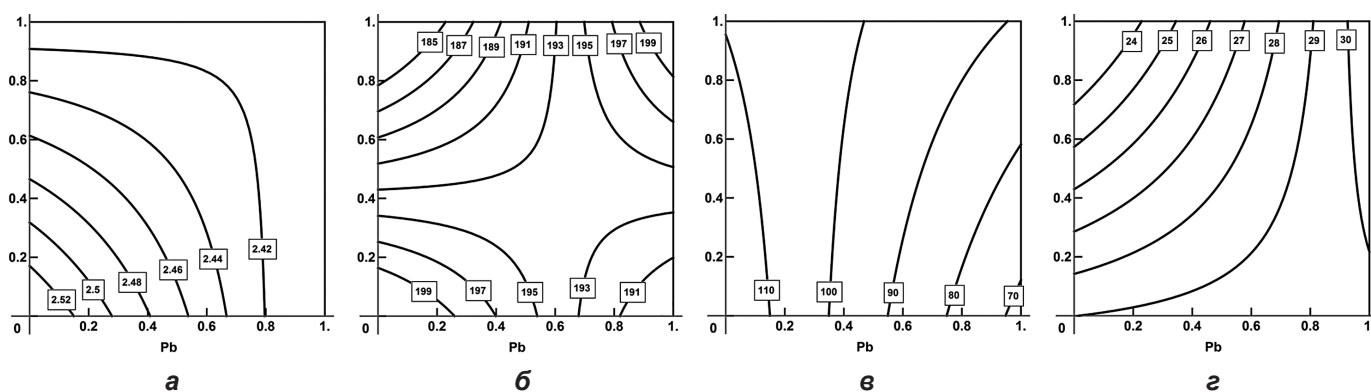


Рис. 3. Примеры изоболограмм, иллюстрирующих неоднозначность сочетанного действия мышечной нагрузки и свинцовой интоксикации на различные показатели: а – уровень Са в сыворотке крови (от аддитивного действия до субаддитивности); б – амплитуда зубца Т во 2-м отведении (сложная картина: от субаддитивного при низких дозах свинца и физнагрузки через антагонизм до синергизма при высоких); в – активное напряжение в трабекулах (однофакторное влияние свинца при его низких дозах переходит в противонаправленное при высоких); г – то же в папиллярных мышцах (противонаправленное действие при низких дозах свинца переходит в его однофакторное действие при высоких) при $L = 0,95 Lmax$.

Fig. 3. Examples of isobolograms, illustrating the diversity of the combined action of running exercise and lead intoxication on some indices: а – total Ca (from additive action to subadditivity); б – Т wave amplitude at lead 2 (complicated picture: from subadditive at low lead doses and physical exercise through antagonism to synergism at high doses); в – active tension in the trabeculae (single-factor action of lead at low doses turns into opposite action at high doses); г – the same in the papillary muscles (the opposite action at low doses of lead transforms into its single-factor action at high doses) at $L = 0,95 Lmax$.

Обсуждение

Развившаяся интоксикация в группе, подвергавшейся воздействию только свинца, может быть охарактеризована как умеренно выраженная. Приведённые выше изменения (рост содержания копропорфиринов, увеличение процентного соотношения ретикулоцитов и снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците) указывают на типичные нарушения порфиринового обмена и синтеза гема при свинцовой интоксикации. В данном случае мы наблюдали предвестники развития свинцовой анемии.

Снижение уровня кальция в сыворотке крови (см. табл. 1) в случае свинцовой интоксикации, вероятно, связано со свинцово-кальциевым антагонизмом [23], а при физических нагрузках может объясняться повышенной потребностью мышц в кальции [24]. Рост КК-МВ в группе «Pb + Бег» может косвенно указывать на усиление повреждения миокарда свинцом на фоне физических нагрузок. VEGF обеспечивает стимуляцию пролиферации и роста эндотелиальных клеток сосудов, а также повышает их выживаемость [25]. При известном эффекте свинца вызывать гипоксию в клетках и тканях увеличение VEGF (см. табл. 1) в группе «Pb + Бег», приводящее к росту эндотелия сосудов, может являться компенсаторным механизмом в борьбе организма с гипоксией.

Многими исследователями показана связь между ростом концентрации свинца в крови и развитием гипертонии [4, 26]. В нашем исследовании не было обнаружено достоверных изменений параметров артериального давления, что может быть связано с адаптационными изменениями состояния сосудов и миокарда под воздействием свинца и мышечной нагрузки при данной продолжительности эксперимента.

Электрокардиографические изменения (см. табл. 1) при свинцовой интоксикации, а именно снижение изоэлектрической линии, могут указывать на токсическое повреждение миокарда и метаболические нарушения в нём. В то же время рост амплитуды зубца Т говорит о нарушении процессов реполяризации миокарда, что может влиять на фазу расслабления миокарда в сердечном цикле.

Снижение способности генерировать силу в изометрическом режиме сокращения более мягкими пристеночными трабекулами (см. рис. 1, а) может быть причиной отсутствия роста систолической силы в целостном сердце и коррелировать с отсутствием изменений артериального давления в отличие от результатов, полученных другими авторами [27]. Из описанных изменений нормализованной максимальной скорости развития напряжения в изометрическом режиме сокращения можно предположить, что у тренированных крыс быстрее идут процессы восстановления, а свинцовая интоксикация их замедляет. А при сочетанном действии этих двух факторов процессы восстановления замедляются ещё сильнее, чем при изолированном действии свинца.

Уменьшение скоростных показателей и рост временных характеризуют удлинение цикла «сокращение-расслабление» при свинцовой интоксикации, что может служить адаптационным компенсаторным механизмом для сохранения фракции выброса в целостном сердце. Временной ход развития и спада напряжения в изометрическом сокращении определяется двумя основными детерминантами – соотношением изоформ миозина и скоростями процессов, участвующих в кальциевой регуляции сокращений [28, 29]. Полученные нами данные об изменении соотношения быстрых и медленных изоформ миозина в сторону более медленных изоформ (см. табл. 2) могут быть предвестниками развития гипертрофии миокарда, которая в данном эксперименте проявилась лишь на молекулярном уровне. Дополнительным аргументом в пользу развития гипертрофии может служить тот факт, что ранее в аналогичном эксперименте было показано утолщение кардиомиоцитов при свинцовой интоксикации на гистологических препаратах [30].

При свинцовой интоксикации не было обнаружено значимого снижения производимой мышцами работы, что говорит об устойчивости и силе защитных механизмов сердца.

При свинцовой интоксикации снижение скоростных и рост временных показателей изометрического сокращения, а также снижение максимальной скорости изотонического укорочения коррелирует со снижением скорости скольжения регулируемых тонких филаментов и изменением соотношения α - и β -тяжёлых цепей миозина (ТЦМ) и частично объясняется ростом доли более медленных β -ТЦМ. Данные корреляции были показаны нами ранее в аналогичных экспериментах [20].

Использованная в эксперименте мышечная нагрузка сама по себе не вызывает изменения соотношения α - и β -ТЦМ. Как следствие, на тканевом уровне организации миокарда мы не наблюдали изменения скоростных показателей сокращения многоклеточных препаратов как в изометрическом, так и в физиологическом режимах. В то же время при сочетанном действии свинца и мышечных нагрузок наблюдали ослабление действия свинца, выраженное в нормализации как скорости скольжения регулируемых тонких филаментов, так и соотношения α - и β -ТЦМ, что на тканевом уровне привело к нормализации максимальной скорости изотонического укорочения, но максимальная скорость развития изометрического сокращения осталась сниженной. Скоростные характеристики развития напряжения в изометрическом режиме и укорочения в изотоническом зависят от двух основных факторов: кинетики поперечных миозиновых мостиков, определяемой соотношением α - и β -ТЦМ, и скоростей кальциевого перехода в кардиомиоците.

Полученные результаты позволяют предположить, что в миокарде, подвергающемся сочетанному действию свинца и мышечных нагрузок, в изотоническом режиме решающим фактором является восстановление кинетики миозиновых поперечных мостиков под влиянием нагрузки. В то же время развитие изометрического напряжения в большей степени контролируется кальциевым переходом, который, по-видимому, не претерпел изменений в ответ на мышечные нагрузки.

Заключение

При умеренно выраженной субхронической свинцовой интоксикации наблюдали:

- сдвиг соотношения в сторону медленных β -тяжёлых цепей миозина правого желудочка сердца, рост временных и снижение скоростных показателей сокращения миокарда, а также снижение скорости скольжения регулируемых тонких филаментов в *in vitro* motility assay. В сочетании с ранее показанным утолщением кардиомиоцитов [30] эти данные могут свидетельствовать о развитии концентрической гипертрофии сердца на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, которая в исследованных условиях экспериментальных воздействий скомпенсирована на уровне целостного организма (отсутствуют гемодинамические изменения);
- сохранение эффективности контрактильного аппарата, оцениваемой по величине производимой изолированными мышцами работы. Последняя в целостном организме имеет наибольшее гемодинамическое значение, а её сохранение указывает на включение компенсаторных механизмов в сердце в ответ на влияние свинца.

На фоне развития умеренно выраженной свинцовой интоксикации у крыс исследованные в эксперименте повторные кратковременные физические нагрузки в целом ослабляли эффекты свинца на сердечно-сосудистую систему:

- физическая нагрузка при свинцовой интоксикации нормализовала уровень кальция и активность ангиотензин-превращающего фермента в сыворотке крови, вольтаж изоэлектрической линии и амплитуду зубца Т на электрокардиограмме;

- влияние физической нагрузки при свинцовой интоксикации на сократимость миокарда неоднозначно: нормализовались активное напряжение и максимальная скорость изотонического укорочения в трабекулах, но при этом снизилась максимальная скорость развития силы в изометрическом режиме в обоих типах мышц;
- при сочетанном действии физических нагрузок и свинцовой интоксикации частично нормализовалась максимальная скорость скольжения регулируемых

тонких филаментов по миозину, что коррелирует с частичной нормализацией соотношения тяжёлых цепей миозина.

Методом Response Surface Methodology подтверждена вариабельность типа сочетанного действия химического и физического факторов для сердечно-сосудистой системы крыс, который зависит от эффекта, по которому он оценивается, от уровня этого эффекта, от соотношения доз и от типа исследуемого объекта.

Литература

(п.п. 1, 5–30 см. References)

- Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям «ИТС 13-2020 Производство свинца, цинка и кадмия». М.: Бюро НТД; 2020.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». М.; 2020.
- Трахтенберг И.М., Лубянова И.П., Апыхтина Е.Л. Роль свинца и железа как техногенных химических загрязнителей в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *Медицина профилактическая*. 2010; 49(7–8): 36–9.

References

- Key scientific findings for lead (KSFFL). United Nations Environment Program; 2010. Available at: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/22871/Key_Scientific_Findings_Lead_EN.pdf
- Information and Technical Guide to the Best Available Technologies «ITS 13-2020 Production of Lead, Zinc and Cadmium» [Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям «ИТС 13-2020 Производство свинца, цинка и кадмия»]. Moscow: Byuro NTD; 2020. (in Russian)
- State Report «On the State of Sanitary and Epidemiological Well-Being of the Population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020. (in Russian)
- Trakhtenberg I.M., Lubyanova I.P., Apykhina E.L. Lead and iron as man-made chemical pollutants in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Meditsina profilakticheskaya*. 2010; 49(7–8): 36–9. (in Russian)
- Alissa E.M., Ferns G.A. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J. Toxicol*. 2011; 2011: 870125. <https://doi.org/10.1155/2011/870125>
- Solenkova N.V., Newman J.D., Berger J.S., Thurston G., Hochman J.S., Lamas G.A. Metal pollutants and cardiovascular disease: mechanisms and consequences of exposure. *Am. Heart J*. 2014; 168(6): 812–22. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.07.007>
- Lamas G.A., Navas-Acien A., Mark D.B., Lee K.L. Heavy metals, cardiovascular disease, and the unexpected benefits of chelation therapy. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2016; 67(20): 2411–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.066>
- Yang W.Y., Zhang Z.Y., Thijs L., Cauwenberghs N., Wei F.F., Jacobs L., et al. Left ventricular structure and function in relation to environmental exposure to lead and cadmium. *J. Am. Heart Assoc*. 2017; 6(2): e004692. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004692>
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington; 2017. Available at: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>
- Llerena F., Maynar M., Barrientos G., Palomo R., Robles M.C., Caballero M.J. Comparison of urine toxic metals concentrations in athletes and in sedentary subjects living in the same area of Extremadura (Spain). *Eur. J. Appl. Physiol*. 2012; 112(8): 3027–31. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2276-6>
- Maynar-Mariño M., Llerena F., Bartolomé I., Crespo C., Muñoz D., Robles M.C., et al. Effect of long-term aerobic, anaerobic and aerobic-anaerobic physical training in serum toxic minerals concentrations. *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2018; 45: 136–41. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.10.007>
- Roshan V.D., Assali M., Moghaddam A.H., Hosseinzadeh M., Myers J. Exercise training and antioxidants: effects on rat heart tissue exposed to lead acetate. *Int. J. Toxicol*. 2011; 30(2): 190–6. <https://doi.org/10.1177/1091581810392809>
- Shahandeh M., Roshan V.D., Hosseinzadeh S., Mahjoub S., Sarkisian V. Chronic exercise training versus acute endurance exercise in reducing neurotoxicity in rats exposed to lead acetate. *Neural Regen. Res*. 2013; 8(8): 714–22. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.08.006>
- Nikitina L.V., Kopylova G.V., Shechepkin D.V., Katsnelson L.B. Study of the interaction between rabbit cardiac contractile and regulatory proteins. An in vitro motility assay. *Biochemistry (Mosc.)*. 2008; 73(2): 178–84. <https://doi.org/10.1134/S0006297908020090>
- Gordon A.M., Homsher E., Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev*. 2000; 80(2): 853–924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>
- Shaffer J.F., Wong P., Bezold K.L., Harris S.P. Functional differences between the N-terminal domains of mouse and human myosin binding protein-C. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010; 2010: 789798. <https://doi.org/10.1155/2010/789798>
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Mashanov G.I., Molloy J.E. Automatic detection of single fluorophores in live cells. *Biophys. J*. 2007; 92(6): 2199–211. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.081117>
- Protsenko Y.L., Katsnelson B.A., Klinova S.V., Lookin O.N., Balakin A.A., Nikitina L.V., et al. Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility. *Food Chem. Toxicol*. 2018; 120: 378–89. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>
- Katsnelson B.A., Klinova S.V., Gerzen O.P., Balakin A.A., Lookin O.N., Lisin R.V., et al. Force-velocity characteristics of isolated myocardium preparations from rats exposed to subchronic intoxication with lead and cadmium acting separately or in combination. *Food Chem. Toxicol*. 2020; 144: 111641. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111641>
- Mast F., Elzinga G. Heat released during relaxation equals force length area in isometric contractions of rabbit papillary muscle. *Circ. Res*. 1990; 67(4): 893–901. <https://doi.org/10.1161/01.res.67.4.893>
- Myers R.H., Montgomery D.C., Anderson-Cook Ch.M. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. (Wiley Series in Probability and Statistics). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.; 2016.
- Rius R.A., Govoni S., Trabucchi M. Regional modification of brain calcium antagonist binding after in vivo chronic lead exposure. *Toxicology*. 1986; 40(2): 191–7. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(86\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0300-483X(86)90078-8)
- Lombardi G., Ziemann E., Banfi G., Corbetta S. Physical activity-dependent regulation of parathyroid hormone and calcium-phosphorous metabolism. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(15): 5388. <https://doi.org/10.3390/ijms21155388>
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999; 56(3): 794–814. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00610.x>
- Silveira E.A., Siman F.D., de Oliveira Faria T., Vescovi M.V., Furieri L.B., Lizardo J.H., et al. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. *Free Radic. Biol. Med*. 2014; 67: 366–76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.021>
- Carmignani M., Boscolo P., Poma A., Volpe A.R. Kininergic system and arterial hypertension following chronic exposure to inorganic lead. *Immunopharmacol*. 1999; 44(1-2): 105–10. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(99\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00115-0)
- Sugiura S., Kobayakawa N., Fujita H., Yamashita H., Momomura S., Chaen S., et al. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique. Molecular basis for cardiac adaptation. *Circ. Res*. 1998; 82(10): 1029–34. <https://doi.org/10.1161/01.RES.82.10.1029>
- Morgan J.P., Chesebro J.H., Pluth J.R., Puga F.J., Schaff H.V. Intracellular calcium transients in human working myocardium as detected with aequorin. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1984; 3(2 Pt. 1): 410–8. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(84\)80028-5](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(84)80028-5)
- Klinova S.V., Minigalieva I.A., Privalova L.I., Valamina I.E., Makeyev O.H., Shuman E.A., et al. Further verification of some postulates of the combined toxicity theory: New animal experimental data on separate and joint adverse effects of lead and cadmium. *Food Chem. Toxicol*. 2020; 136: 110971. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110971>